

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS
EN LA TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Diaa Ahmed Mohamed Abd El-Moneim

Bajo la dirección de los doctores

César Benito Jiménez
Francisco Gallego Rodríguez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES
IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA AL ALUMINIO EN
CENTENO**

TESIS DOCTORAL

DIAA AHMED MOHAMED ABD EL-MONEIM

MADRID, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Aislamiento, caracterización estructural y regulación de la
expresión de genes implicados en la tolerancia al aluminio en
centeno**

**Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la
Universidad Complutense de Madrid presenta**

DIAA AHMED MOHAMED ABD EL-MONEIM

Vº Bº Director de la Tesis

Prof. Cesar Benito Jiménez

Prof. Francisco Javier Gallego Rodríguez

MADRID, 2012

*AL ALMA DE MI PADRE,
A MI MADRE,
A MI QUERIDA MAYSA,
A MIS NIÑAS SHAZA Y HANA,
A LAS ALMAS DE LOS MÁRTIRES DE LA REVOLUCIÓN DE ENERO 2011*

*Ningún número de experimentos, por muchos que sean,
Podrán demostrar que tenga razón. Tan solo un
Experimento puede demostrar que estoy equivocado*

(Albert Einstein)

Hace solamente cuatro años que me embarqué en este trabajo (el mundo del aluminio) y ya estoy agradeciendo a toda la gente que me ha apoyado, ayudado, sobre todo, aguantado durante este tiempo. En fin..... ¡Cómo pasa el tiempo!

Quisiera mostrar mi agradecimiento a toda esa gente que me ha apoyado durante tantos años para poder realizar mi objetivo. Seguro que me olvido de alguien, pero espero que si se da cuenta me perdone.

En primer lugar dirijo mi más sincero agradecimiento al Dr. Cesar Benito y al Dr. Javier Gallego, debido a que sin su excelente dirección, la realización de esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a Cesar Benito, mejor conocido como "Mario" no tengo palabras para describirle mi admiración y gratitud. Muchas gracias por tener tanta paciencia conmigo hasta el final, su incesante esfuerzo, apoyo, y sobre todo, por la confianza en mí durante estos años. Gracias al Dr. Javier Gallego por toda la ayuda que me ha prestado especialmente en la recta final.

Igualmente los agradecimientos al Prof. Dr. Concepción Romero Martínez "Conchita", directora del Departamento de Genética, por las facilidades concedidas para la realización de esta tesis. A los diferentes profesores del Departamento, porque siempre me han apoyado.

A mis compañeros del departamento que han sido mi familia durante la mayor parte de este trabajo. Dentro de muchos otros recuerdo a (Cito A) Mónica Pradillo, Javier Varas, Cecilia Oliver, Eduardo Corredor. (Genética Molecular) Patricia Marín, Alejandra Cruz, Mari Carmen, Alberto Bellido, Beatriz Matallanas, Elisa Iniesto, Bárbara Téllez. (Cito B) Miriam González, María Cuacos. (Evolutiva) Enrique Sánchez, Diego Bersabé.

*Efectivamente, sin la ayuda de mis compañeros del laboratorio nada de esto hubiera sido posible. A todos los que siempre han estado dispuestos a resolver mis dudas y a darme consejos. Por todo ello debo dar las gracias a todos los que me han guiado y ensañado en algún momento a Javier Silva (con el cual todos los problemas son resueltos), Ana luisa García (siempre me decía: *don't worry everything will be OK*), Naike Salvador, Roberto Contreras, José Manuel Ramos, Miriam Torres, Bea Sánchez, Bea Pérez, Elisabeth. Les digo a todos: Trabajar con vosotros ha sido y sigue siendo un placer.*

A mis amigos de fuera del laboratorio, que tienen paciencia y aceptan la tesis como otra carga cualquiera. A Tarek, safwat, Amr, Fouad, Haytham, Mohamed moaed, Ahmed, Asem, Nasem, Waled, Adel, Mohamed Anis, Ahmed Ibrahim, Dr/ yaser, Dr/ Amal y Dr/Mohamed .

También quiero agradecer, muy especialmente a Pilar Arnáez Aguirre por su inestimable ayuda en la escritura.

GRACIAS al Programa Erasmus Mundus External Cooperation Window. por haber financiado parcialmente mi estancia en España durante todo este proceso formativo. Gracias por su solidaridad eficaz y por creer que el desarrollo de las naciones depende fundamentalmente de la educación de sus ciudadanos. De igual manera, agradezco a la SCU (Universidad Canal de Suez) y a mi País Egipto, por haber aportado la contraparte de la beca de estudios.

Debo dar las gracias también a mi familia y a mis amigos por aguantar mi mal humor. Gracias a mi Padre por servirme de ejemplo. Lo más importante que he aprendido, no se encuentra en los libros, me lo has enseñado tú. A mi madre por su amor, su paciencia y por ser la mejor madre del mundo. Este trabajo mamá es fruto de tu incesante espíritu luchador por la vida de tus hijos. A mis hermanos, Basem, Shady, Bahy, Mahmud y Amany.

A Maysa. Por estar a mi lado; por darme equilibrio; por su infinita confianza en mí; porque todas las dificultades han sido ligeras siempre y cuando estaba conmigo. Por su generosidad.

iiiiGRACIAS A TODOS!!!!

.

ÍNDICE

I-INTRODUCCIÓN

1- Tolerancia al aluminio.....	3
1.1-Importancia y alcance del problema de la toxicidad por Aluminio en suelos ácidos.....	3
1.2-Distribución global de los suelos ácidos.....	4
1.3-La infertilidad de los suelos ácidos.....	7
1.4-El aumento de la población mundial.....	8
1.5-Métodos empleados para determinar el grado de Tolerancia al Aluminio.....	10
2-La tolerancia al Aluminio.....	14
2.1-Control Genético de la Tolerancia al Aluminio.....	15
2.1.1-Control Genético en trigo.....	17
2.1.2-Control Genético en Centeno.....	18
2.1.3-Control Genético en Triticale.....	19
2.1.4-Control Genético en Cebada.....	20
2.1.5-Control Genético en Avena.....	20
2.1.6-Control Genético en Maíz.....	21
2.1.7-Control Genético en Sorgo.....	21
2.1.8-Control Genético en Arroz.....	21
2.1.9-Control Genético en Arabidopsis.....	22
2.1.10-Control Genético en alfalfa.....	22
2.2-Base molecular de la Tolerancia al Aluminio.....	22
2.3-Exclusión de Al mediante exudación de ácidos orgánicos.....	26
2.3.1-A través de ácido málico y de proteínas transportadoras de tipo ALMT1.....	26
2.3.1.1-Trabajos llevados a cabo en trigo.....	26
2.3.1.2-Trabajos realizados en Arabidopsis.....	32
2.3.1.3-Resultados obtenidos en centeno.....	35
2.3.1.4-Resultados en otras especies.....	37
2.3.2-A través de ácido cítrico y de proteínas transportadoras de tipo Alt_{SB} y de tipo MATE.....	38

2.3.2.1-Trabajos realizados en Sorgo.....	38
2.3.2.2-Resultados obtenidos en cebada.....	40
2.3.2.3-Resultados obtenidos en centeno, trigo, maíz y arroz.....	42
2.3.3-A través de oxalato.....	46
2.3.4-Metabolismo de los ácidos orgánicos.....	47
3-La composición de la pared celular.....	50
3.1-Pectin Metilesterasa (PME).....	52
3.2-Relación entre PME y las respuestas frente al estrés biótico y abiótico en las plantas.....	54
3.3-Los genes ALS que codifican proteínas transportadoras de tipo ABC.....	56
3.4-Exudación de aniones orgánicos por deficiencia de fósforo (P).....	57
3.5-Mensajeros que se inducen por estrés con aluminio.....	57
4-El centeno.....	58
4.1-Taxonomía.....	58
4.2-Origen del centeno cultivado.....	64
4.3-Morfología y citología.....	65
4.4-Distribución geográfica del centeno.....	68
4.5-Importancia económica.....	69
4.6-Centeno y salud.....	72
4.7-Relación entre el genoma de centeno y los genomas de otras especies de Poáceas.....	72
II-OBJETIVO.....	77
III-MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
1-Material vegetal.....	80
2-Métodos.....	82
2.1-Test Básico de Tolerancia al Aluminio.....	82
2.1.1-Tinción con Eriocromo de Cianina R.....	82
2.1.2-Tinción con Hematoxilina.....	83
2.2- Test Adicionales de Tolerancia al Aluminio.....	84
2.2.1-Distribución y acumulación del Al.....	84

2.2.2-Visualización de la peroxidación lipídica.....	84
2.2.3-Determinación de la muerte celular.....	84
2.3-Aislamiento y purificación de DNA.....	84
2.4-Aislamiento y purificación de RNA.....	85
2.5-Valoración y cuantificación de ácidos nucleicos.....	85
2.6-Amplificación de ácidos nucleicos por PCR.....	85
2.7-Clonación y secuenciación.....	86
2.8-Análisis de secuencias.....	87
2.9-Identificación de secuencias flanqueantes.....	88
2.10-Análisis de la expresión génica.....	88
2.10.1-Transcripción inversa en ensayos de expresión génica.....	88
2.10.2-Exposición de plántulas al aluminio.....	89
2.10.3-Determinación de la expresión génica mediante PCR semicuantitativa.....	89
2.10.4-PCR cuantitativa en tiempo real mediante SYBR Green I.....	89
2.10.5-Análisis de las PCRs cuantitativas en tiempo real.....	90
IV-RESULTADOS.....	92
1-Evaluación De La Tolerancia Al Aluminio Mediante Cultivo Hidropónico En Una Colección De Cultivares De Centeno.....	93
1.1-Evaluación de tolerancia de los genotipos mediante estimación del crecimiento de las raíces.....	93
1.2-Tinción con hematoxilina.....	96
1.3-Correlación entre los diferentes parámetros utilizados para estimar la tolerancia.....	97
1.4-Otros métodos de tinción que permiten evaluar la acumulación de aluminio y los daños que produce en las raíces.....	98
1.4.1-Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	99
1.4.2-Peroxidación lipídica.....	100
1.4.3-Contenido y localización del aluminio.....	101
2-Genes Relacionados Con La Tolerancia Al Estrés Por Aluminio En Centeno	102
2.1-Análisis de la diversidad del gen <i>ScALMT1</i> en diversos cultivares de <i>Secale cereale</i>	102

2.2-Identificación y caracterización de algunos genes mitocondriales involucrados en el metabolismo de ácidos orgánicos exudados por las raíces en respuesta al estrés por Al.....	104
2.2.1-Identificación y caracterización de dos genes de Malato Deshidrogenasa Mitocondrial (<i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i>) en centeno.....	105
2.2.1.1-Aislamiento y secuenciación de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i>	105
2.2.1.2-Localización cromosómica de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i>	109
2.2.1.3-Análisis de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> en centeno.....	110
2.2.1.4-Análisis de la expresión de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i>	112
2.2.1.4.1-Cambios en las cantidades del ARN mensajero del gen <i>ScMDH1</i>	113
2.2.1.4.2-Cambios en las cantidades del ARN mensajero del gen <i>ScMDH2</i>	115
2.2.1.5-Relaciones filogenéticas detectadas comparando las secuencias de nucleótidos de los ADNc y de las proteínas codificadas por <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> con las de otras especies de Poáceas.....	118
2.2.1.6- Diversidad molecular en centeno y en Poáceas.....	120
2.2.2-Identificación y caracterización de la Citrato Sintasa (CS) mitocondrial de centeno.....	122
2.2.2.1-Identificación y secuenciación del gen <i>ScCS</i>	122
2.2.2.2-Localización cromosómica del gen <i>ScCS</i>	126
2.2.2.3-Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína <i>ScCS</i> en centeno.....	127
2.2.2.4-Análisis de la expresión del gen <i>ScCS</i>	127
2.2.2.5-Relaciones filogenéticas entre miembros de la citrato sintasa mitocondrial de cereales.....	130
2.2.2.6-Diversidad Molecular en Centeno y Poáceas.....	133
2.2.3- Identificación y Caracterización de la Fumarasa Mitocondrial <i>ScFUM</i> de centeno.....	135
2.2.3.1-Identificación y Secuenciación del gen <i>ScFUM</i>	135
2.2.3.2-Localización cromosómica del gen <i>ScFUM</i>	137

2.2.3.3-Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína <i>ScFUM</i> de centeno.....	138
2.2.3.4- Análisis de la expresión del gen <i>ScFUM</i>	139
2.2.3.5-Relaciones filogenéticas entre miembros de la fumarasa mitocondrial de cereales.....	141
2.2.3.6-Diversidad molecular en centeno y poáceas.....	143
2.2.4-Comparación de las cantidades de ARNm entre el cultivar tolerante y la línea consanguínea sensible en todos los genes analizados.....	145
2.2.5-Comparación entre las cantidades de ARNm de las raíces y las hojas para los distintos genes estudiados.....	147
2.2.6-Comparación de la expresión (cantidades relativas) de los ARNm de los genes aislados en esta tesis con las cantidades de los ARNm de genes candidatos de tolerancia o involucrados en la tolerancia en estudios previos.....	148
2.2.7-Localización subcelular de las proteínas hipotéticas codificadas por los genes <i>ScMDH1</i> , <i>ScMDH2</i> , <i>ScCS</i> y <i>ScFUM</i> aislados en este trabajo.....	150
2.3-Identificación y caracterización de un gen involucrado en el mantenimiento de la pared celular en centeno.....	151
2.3.1-Identificación y caracterización de una pectin metilesterasa <i>ScPME</i> de centeno.....	152
2.3.2-Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína <i>ScPME</i> de centeno.....	154
2.3.3-Estructura de la proteína <i>ScPME</i> esperada.....	155
2.3.4-Localización cromosómica del gen <i>ScPME</i>	156
2.3.5-Determinación del patrón de expresión del gen <i>ScPME</i> mediante RT-PCR Semicuantitativa.....	157
2.3.6-Relaciones filogenéticas entre miembros de la pectin metil esterasa de cereales.....	159
2.3.7-Diversidad molecular en centeno y otras poáceas.....	161
V- DISCUSIÓN.....	165
5.1 Evaluación de la tolerancia al estrés por Al mediante estimación del crecimiento de las raíces.....	166
5.2 Variabilidad del gen <i>ScALMT1</i> en diferentes cultivares de centeno.....	168

5.3 Identificación y caracterización de algunos genes involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos exudados en respuesta al estrés por Al y de genes implicados en el mantenimiento de la pared celular.....	170
5.4 Análisis de la variabilidad de los genes estudiados en <i>Secale cereale</i> y en distintas especies de Poáceas.....	173
5.5 Estudios de expresión de los mensajeros de los genes aislados.....	174
VI. CONCLUSIONES.....	183
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	186
VIII. APÉNDICES.....	
APÉNDICES I.....	215
APÉNDICES II.....	CD.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

I LISTAS DE TABLAS:-

Tabla	Título	Página
1.1	Ácidos orgánicos (AO) exudados por las raíces de diferentes especies vegetales en respuesta al estrés por Aluminio.	16
1.2	Resumen de algunos de los genes involucrados en la tolerancia o resistencia al aluminio (Al ³⁺) en diferentes especies	27
1.3	Genes de citrato sintasa y malato deshidrogenasa introducidos en otras especies	48
1.4	Reducción de la superficie de cultivo y de la producción de centeno en España desde 1975 hasta 1997	71
1.5	Número de cromosomas, tamaño del genoma en millones de pares de bases (Mpb) y publicación en centeno, trigo duro (tetraploide), trigo blando (hexaploide) y cebada	76
3.1	Nombres y países del origen de los cultivares de centeno utilizados en los estudios de variabilidad	80
3.2	Líneas de Centeno y Trigo utilizadas en este trabajo	81
3.3	Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo hidropónico de centeno	82
3.4	Programas utilizados para deducir la estructura de las proteínas estudiadas	87
3.5	Programas de búsqueda de motivos reguladores de la transcripción	88
4.1	Valores medios de tres replicas independientes. Porcentaje del recrecimiento de las raíces después del tratamiento, Porcentaje de reducción del crecimiento total de las raíces y tinción con hematoxilina.	94
4.2	Coeficientes de correlación simple entre las tres parejas posibles de los parámetros estudiados (<i>P-value</i> * <0.05 ** <0.01).	98
4.3	Cultivares en los que se ha detectado al menos una posición con dos picos de igual altura en los electroferogramas	103
4.4	Variabilidad detectada en diferentes genotipos o cultivares de centeno en parte de la región promotora, en los exones 1 y 6 y en el intrón 5.	104
4.5	Variabilidad detectada entre diferentes genotipos o cultivares de centeno (tres cultivares y una línea consanguínea) en los ADNc del gen <i>ScMDH1</i> .	121
4.6	Variabilidad detectada entre diferentes genotipos o cultivares de centeno (tres cultivares y una línea consanguínea) en los ADNc del gen <i>ScMDH2</i> .	121
4.7	Variabilidad detectada en los ADNc completos de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> entre diferentes especies de Poáceas (incluida centeno).	122
4.8	Variabilidad detectada entre diferentes genotipos o cultivares de centeno (tres cultivares y una línea consanguínea) y 8 secuencias (una de Ailes, cuatro de Imperial, dos de Petkus y otra de Riodeva) en los ADNc del gen <i>ScCS</i> . Analizada por exones y para el ADNc completo	133
4.9	Variabilidad detectada entre siete especies de Poáceas, incluida	134

	centeno Analizada por exones y para el ADNc completo de ScCS	
4.10	Variabilidad detectada en los ADNc completos del genes ScCS entre diferentes cultivares de centeno y entre distintas especies de Poáceas (incluida centeno).	134
4.11	Variabilidad detectada entre las cuatro muestras de centeno (Ailes, Imperial, Petkus y Riodeva. Analizada por exones y para el ADNc completo de ScFUM.	144
4.12	Variabilidad detectada entre seis especies de Poáceas, incluida centeno Analizada por exones y para el ADNc completo de FUM	145
4.13	Variabilidad detectada en los ADNc completos del genes ScFUM entre diferentes cultivares de centeno y entre distintas especies de Poáceas (incluida centeno).	145
4.14	Valores de probabilidad obtenidos con el programa TargetP 1.1 que predice localizaciones subcelulares a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteínas.	151
4.15	Variabilidad detectada entre las cuatro muestras de centeno (Ailes, Imperial, Petkus y Riodeva. Analizada por exones y para el ADNc completo de ScPME.	163
4.16	Variabilidad detectada entre cinco especies de Poáceas, incluida centeno (un total de 5 secuencias, las mismas que las incluidas en el dendrograma de la Figura 4. 41). Analizada por exones y para el ADNc completo de PME	164
4.17	Variabilidad detectada en los ADNc completos del genes PME entre diferentes cultivares de centeno y entre distintas especies de Poáceas (incluida centeno).	164
5.1	Resumen de los resultados de caracterización, estructura en exones e intrones, localización cromosómica, comparación de identidades y similitudes, relaciones filogenéticas, estructuras proteicas secundarias y terciarias y localización subcelular.	172

II LISTAS DE FIGURAS:-

Figura	Título	Página
1.1	Solubilidad de diferentes minerales a distintos pH	3
1.2	Distribución Mundial de los suelos	6
1.3	Distribución Europea de los suelos	6
1.4a	Inhibición del crecimiento de las raíces en plantas de centeno no tolerantes (NT) y tolerantes al aluminio tratadas con aluminio.	8
1.4b	Tolerancia de la línea de translocación 3DS.3RL (ST22) y la línea no sustituida (ST2) de Triticale al suelo ácido.	8
1.4c	Desarrollo raquítrico de las plantas no tolerantes (NT) que crecen en suelos ácidos.	8
1.5	Método de evaluación de la tolerancia al aluminio basado la medición del crecimiento de las raíces.	11
1.6	Tinción con hematoxilina para identificar genotipos tolerantes al Aluminio de trigo.	11
1.7	Tinciones de raíces de tabaco tratadas y sin tratar con Al con diferentes compuestos. Morín, DCF-DA y El reactivo de Schiff.	12

1.8	Efecto del Al en el crecimiento de las raíces de genotipos de trigo que difieren en la tolerancia al aluminio en el locus Alt1.	13
1.9	Patrones de exudación de ácidos orgánicos descritos en plantas.	23
1.10	Patrones de exudación de ácidos orgánicos (AO).	24
1.11	Color de los sépalos de Hydrangea (hortensias) con diferentes concentraciones de aluminio (Al).	25
1.12	Entrada, transporte y acumulación de diferentes formas de Al ³⁺ en <i>Fagopyron esculentum</i> .	25
1.13	Estructura del gen <i>TaALMT1</i> .	28
1.14	Dendrograma obtenido con algunos RNA mensajeros de la familia ALMT de diferentes especies.	32
1.15a	Mapa del cromosoma 7R.	36
1.15b	Estructura en intrones y exones del gen <i>ScALMT1</i> de <i>S.cereale</i> .	36
1.15c	Localización cromosómica del gen <i>ScALMT1</i> en el brazo 7RS de centeno.	36
1.15d	PCR-RFLP de un fragmento del gen <i>ScALMT1</i> en 10 plantas de una F2 de centeno en la que también segregaba el locus Alt4.	36
1.16	Estructura del gen <i>ScMATE1</i> en centeno. Contiene 13 exones y 12 intrones.	43
1.17	Enzimas claves involucradas en el metabolismo de citrato	49
1.18	Representación esquemática de la pared celular de las plantas superiores	51
1.19	Reacción de desmetil-esterificación de la pectina catalizada por la PME	52
1.20	Motivos estructurales de la pectin metilesterasa (PME).	53
1.21	Modelo de implicación de las PME en la defensa de las plantas.	55
1.22	Esquema en el que se indica que el centeno (<i>Secale cereale</i>) pertenece al género Secale	58
1.23	Resumen de las translocaciones que diferencian a las distintas especies del género Secale.	60
1.24	Dendrograma obtenido con datos de AFLPs en diferentes especies del género Secale.	63
1.25	Centeno (<i>Secale cereale</i> L.)	66
1.26	Distribución mundial del género Secale.	68
1.27	Datos de la FAO de la producción mundial centeno por países en 2009.	71
1.28	Relaciones de sintenia entre los cromosomas de trigo hexaploide (<i>Triticum aestivum</i>) y de centeno (<i>Secale cereale</i>).	74
1.29	Relaciones de sintenia entre los cromosomas de trigo (del 1 al 7) y los de arroz (1 al 12).	75
1.30	Relaciones de sintenia entre los cromosomas de <i>Brachypodium distachyon</i> y trigo (izquierda), entre cebada, <i>Brachypodium</i> y <i>Aegilops tauschii</i> (centro) y entre arroz, <i>Brachypodium</i> y sorgo (derecha)	75
1.31	Relaciones filogenéticas entre Sorgo, trigo, <i>Brachypodium</i> , y arroz	76
3.1	Distribución mundial de los cultivares de centeno utilizados en los estudios de variabilidad	81

3.2	Pasos del Test de Tolerancia al Aluminio	83
4.1	Longitud total de las raíces sin Al y con Al.	95
4.2	Grado de tinción con hematoxilina en las raíces después de la exposición a 150 μ m de Al durante 24 horas.	96
4.3	Grado de tención con hematoxilina en la raíz después de la exposición a 150 μ m de Al.	97
4.4	Correlación entre los parámetros RRS, RRL y HS.	99
4.5	Tinción histoquímica con el reactivo DCF-DA para estimar la producción de H ₂ O ₂ y su localización en las raíces.	100
4.6	Tinción histoquímica con el reactivo de Schiff para el análisis de la peroxidación lipídica causada por el aluminio en las raíces (punta y región basal).	101
4.7	Tinción histoquímica con el reactivo Morin para el análisis del contenido y la localización del aluminio en las raíces (punta y región basal).	102
4.8	Esquema de la estructura de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> de centeno.	106
4.9	Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen <i>ScMDH1</i> (parte superior) y del gen <i>ScMDH2</i> (parte inferior) del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas y con <i>Arabidopsis thaliana</i> y soja.	108
4.10	Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de las hipotéticas proteínas codificadas por los genes <i>ScMDH1</i> (parte superior) y <i>ScMDH2</i> (parte inferior) de centeno con las de otras especies de Poáceas y con <i>Arabidopsis thaliana</i> y soja.	109
4.11	Localización cromosómica del gen <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> de centeno.	110
4.12	Estructura secundaria para las hipotéticas proteínas <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> de centeno.	112
4.13	A la izquierda la hipotética estructura terciaria de <i>ScMDH1</i> y a la derecha la de <i>ScMDH2</i> del cultivar Petkus.	112
4.14	Cantidad relativa el mensajero del gen <i>ScMDH1</i> en raíces y hojas del cultivar tolerante Petkus y de la línea consanguínea sensible Riodeva	114
4.15	Cantidad relativa el mensajero del gen <i>ScMDH2</i> en raíces y hojas del cultivar tolerante Petkus y de la línea consanguínea sensible Riodeva	116
4.16	Parte superior: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> en diversas especies de Poáceas. Parte inferior: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de las proteínas hipotéticas de los genes <i>ScMDH1</i> y <i>ScMDH2</i> en diversas especies de Poáceas.	119
4.17	Esquema del gen <i>ScCS</i> del cultivar de centeno Ailés.	124
4.18	Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen <i>ScCS</i> del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas.	125
4.19	Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de la hipotética proteína codificada por el gen	126

	ScCS de centeno y las secuencias de las proteínas otras especies de Poáceas y de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	
4.20	Localización cromosómica del gen ScCS de centeno.	126
4.21	A la izquierda la hipotética estructura secundaria para la hipotética proteína ScCS de centeno. A la derecha la hipotética estructura terciaria de ScCS del cultivar Petkus.	128
4.22	Cantidad relativa el mensajero del gen ScCS en raíces y hojas del cultivar tolerante Petkus y de la línea consanguínea sensible Riodeva	129
4.23	Parte superior: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) del gen ScCS en diversas especies de Poáceas. Parte inferior: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética del gen ScCS en diversas especies de Poáceas.	132
4.24	Estructura del gen ScFUM de centeno.	135
4.25	Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen ScFUM del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas y con Ricino.	136
4.26	Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de la hipotética proteína codificada por el gen ScFUM de centeno y las secuencias de las proteínas otras especies de Poáceas, de <i>Arabidopsis thaliana</i> , de tomata y patata.	137
4.27	Localización cromosómica del gen ScFUM de centeno.	137
4.28	A la izquierda la hipotética estructura secundaria para la hipotética proteína ScFUM de centeno. A la derecha la hipotética estructura terciaria de ScFUM del cultivar Petkus.	138
4.29	Cantidad relativa el mensajero del gen ScFUM en raíces y hojas del cultivar tolerante Petkus y de la línea consanguínea sensible Riodeva	140
4.30	Parte superior: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) del gen ScFUM en diversas especies de Poáceas y con ricino. Parte inferior: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética del gen ScFUM en diversas especies de Poáceas y otras especies vegetales.	143
4.31	Comparación entre el cultivar tolerante (Petkus) y la línea consanguínea sensible (Riodeva) de las cantidades relativas de los ARNm de los distintos genes analizados en esta tesis.	146
4.32	Comparación entre las raíces y las hojas de las cantidades relativas de los ARNm de los distintos genes analizados en esta tesis.	148
4.33	Cantidades relativas de los mensajeros de los genes ScMDH1, ScMDH2, ScCS, ScFUM, ScALMT1, ScMATE1 y ScSTOP1 en raíces y en hojas del cultivar tolerante Petkus y de la línea consanguínea Riodeva.	150
4.34	Esquema de la estructura del gen ScPME de centeno.	152
4.35	Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen ScPME del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas	153

4.36	Porcentajes de identidades y similitudes entre las secuencias de aminoácidos de la hipotética proteína codificada por el gen <i>ScPME</i> de centeno y las secuencias de las proteínas PME de otras especies de Poáceas y de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	154
4.37	A la izquierda la hipotética estructura secundaria. A la derecha la hipotética estructura terciaria de <i>ScPME</i> del cultivar Petkus.	155
4.38	Esquema con los diferentes dominios encontrados en la proteína hipotética <i>ScPME</i> por el programa InterProScan.	156
4.39	Localización cromosómica del gen <i>ScPME</i> de centeno.	157
4.40	Cambios en las cantidades del ARNm del gen <i>ScPME</i> por estrés con Al mediante RT-PCR semicuantitativa.	158
4.41	Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) del gen <i>ScPME</i> en diversas especies de Poáceas y con ricino.	160
4.42	Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética del gen <i>ScPME</i> en diversas especies de Poáceas y otras especies vegetales.	162

I. INTRODUCCIÓN

*Un viaje de mil millas comienza con un paso.
Lao-tzu*

La introducción a esta tesis se ha dividido en dos partes claramente diferenciadas estrechamente relacionadas con las preguntas que se han tratado de resolver y con el material utilizado para llevar a cabo nuestros estudios. La primera parte de la introducción se ha dedicado a revisar la tolerancia al aluminio, su importancia en suelos ácidos, los métodos utilizados para detectar sus efectos, los distintos mecanismos de defensa, los genes de tolerancia descritos en diferentes especies vegetales y, uno de los mecanismos más estudiados hasta el momento, la exudación de ácidos orgánicos (málico, cítrico y oxálico) junto con los principales genes candidatos encontrados hasta la fecha. La segunda parte de la introducción está dedicada al material empleado para la realización de la tesis, en concreto al centeno. El material utilizado para llevar a cabo cualquier estudio genético es de suma importancia. Desde el punto de vista genético el centeno no es un buen material de estudio, es una planta relativamente grande que debe cultivarse en invernaderos o en el campo y que ocupa bastante espacio. No es fácil obtener más de una generación al año. Tiene una gran cantidad de ADN y una enorme cantidad de secuencias repetidas que dificultan el aislamiento de los genes involucrados en los procesos estudiados. Es una especie alógama que presenta una gran variabilidad genética, esta variabilidad es en ocasiones una ventaja y en otras un inconveniente, ya que diferentes plantas del mismo cultivar poseen distintos genotipos para los caracteres analizados. Sin embargo, el centeno comparado con el trigo hexaploide, tiene la ventaja de ser diploide, además, es una planta bastante rústica, resistente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. En lo tocante a la tolerancia al aluminio, el centeno es, hasta la fecha, uno de los cereales más tolerantes que se han descrito. La cebada es muy sensible, algunas especies modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Brachypodium distachyon* son también muy sensibles. El trigo otra de las especies de gran importancia en la alimentación humana es moderadamente tolerante, es decir, existen algunas variedades tolerantes. Sin embargo, en centeno lo difícil es encontrar cultivares o líneas sensibles. Por ejemplo, las pocas líneas de centeno que se clasifican como sensibles son más tolerantes al estrés por Aluminio que los cultivares de trigo clasificados como tolerantes. Por tal motivo nuestro grupo de investigación está interesado en el aislamiento de los posibles genes involucrados en la tolerancia al estrés por Al en centeno y, por ello, hemos creído conveniente dedicarle la segunda parte de la introducción en la que hablaremos de su características, importancia y origen. La mayoría de esta introducción procede de revisiones

previas realizadas por otros autores en la tolerancia al estrés por Al y en los estudios sobre el origen del centeno cultivado que han sido ampliadas con los datos más recientes que hemos encontrado en los trabajos relacionados con estos temas.

1. Tolerancia Al Aluminio:-

1.1 Importancia Y Alcance Del Problema De La Toxicidad Por Aluminio En Suelos Ácidos:-

Los suelos ácidos muestran una baja productividad que se debe a una combinación de minerales tóxicos como el aluminio (Al) y manganeso (Mn) y deficiencias minerales tales como fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg) y molibdeno (Mo). Estas deficiencias se deben a la baja solubilidad de estos minerales a pH ácido (Figura 1.1). De todos estos minerales, el Al (principalmente su catión trivalente Al^{3+}) es tóxico para una gran cantidad de cultivos de gran importancia agrícola y es el principal factor que reduce la productividad en suelos ácidos (Eswaran y col. 1997, Foy y col. 1978, Rao y col. 1993, Kochian 1995).

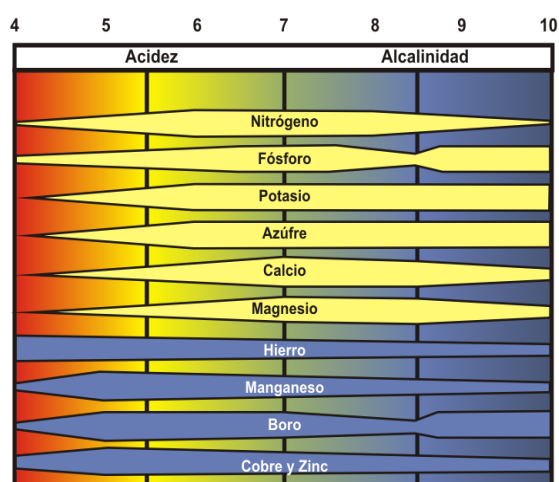


Figura 1.1. Solubilidad de diferentes minerales a distintos pH.

La organización FAO (*Food and Agriculture Organization*) de Naciones Unidas contempla a la toxicidad por Al como la segunda causa más importante de disminución de los rendimientos agrícolas después del riesgo de erosión e indica que afecta al 14,7% de la superficie terrestre (Bot y col. 2000). En comparación, la salinidad y el aumento de sodio afectan cada uno aproximadamente al 3% de la superficie terrestre. Entre el 30 y el 40% de los suelos actualmente cultivados son terrenos de tipo ácido y un 70% de los potencialmente cultivables también lo son (Haug, 1983). La acidez no

solamente afecta aproximadamente al 40% de los suelos cultivados, además se incrementa y acelera por ciertas prácticas de labranza y por la lluvia ácida (Aniol y col. 1980, Haug 1983, Kennedy 1986).

La utilización de productos alcalinizantes y calcáreos (limo) permite mejorar la producción en suelos ácidos, sin embargo, es una solución poco eficaz. El efecto neutralizante del limo se produce en los primeros 25 cm del suelo y no llega a zonas más profundas en las que penetra el sistema radicular (Guedes-Pinto 1985). Además, el empleo de dichos productos alcalinizantes da lugar a un efecto colateral no deseado, la contaminación del suelo.

La toxicidad por Al es el principal factor limitante de la producción agrícola en el África subsahariana, Asia, Oceanía, América central y Sudamérica. En Norteamérica es la segunda causa o factor que reduce la producción. Una revisión realizada recientemente por la FAO indica que casi un tercio de los países tienen problemas de toxicidad por Al en el 25% o más de su superficie (54 de 166 países, Bot y col. 2000). La toxicidad por Al se produce en suelos ácidos con un pH inferior a 5,5. Cuando el pH es inferior a 5,5 los cationes rizotóxicos de Al (Al^{3+}) se solubilizan a partir de aluminosilicatos y otros minerales no tóxicos del suelo (Kochian 1995; Kochian y col. 2004). Las primeras consecuencias de la intoxicación por Al son la inhibición del crecimiento y función de la raíz. Sin embargo, existen consecuencias posteriores tales como un aumento de la susceptibilidad a otros tipos de estrés y una disminución general del rendimiento. Brasil, Argentina y Colombia son los tres mayores productores de maíz de Sudamérica. Brasil y Colombia tienen extensas áreas con toxicidad por Al (63 y 56%, respectivamente) mientras que Argentina esencialmente no tiene suelos con problemas de toxicidad por Al. En 2004, 2005 y 2006 el rendimiento medio del maíz en Colombia fue la tercera parte del obtenido en los mismos años en Argentina, mientras que en Brasil fue aproximadamente la mitad.

1.2 Distribución Global De Los Suelos Ácidos:-

La acidez del suelo está influenciada por factores edáficos, climáticos y biológicos, estando determinada por la cantidad de iones H^+ en solución. El Al es el tercer elemento más abundante después del oxígeno y el silicio, representa un 8% en peso de la corteza terrestre (Fitz Patrick 1986) y forma parte de muchos minerales primarios y secundarios. A pH ácido, estos minerales se disuelven en parte liberando Al en solución al suelo, donde puede

ser hidrolizado y contribuir a la acidez del suelo. Entre los cationes que más contribuyen a la acidez del suelo están los iones Al^{3+} y Fe^{3+} (Thomas and Hargrove 1984).

Los suelos de tipo granítico se acidifican más rápido que los calcáreos. Los suelos arenosos con pocas partículas de arcilla se acidifican más rápido por su menor reserva de cationes alcalinos y mayor capacidad de filtrado. Las lluvias intensas influyen en la acidificación dependiendo del flujo de agua a través del suelo (percolación). La acidificación del suelo se intensifica por la eliminación de los cationes después de la cosecha y por lluvia ácida (Ulrich y col 1980). La materia orgánica en descomposición forma ácido carbónico y otros ácidos débiles que contribuyen a la acidificación (Carver y Ownby 1995). La acidificación del suelo aumenta por aplicaciones repetidas de nitrógeno (práctica normal de labranza) en cantidades que exceden la absorción de los cultivos (Adams 1984). La producción neta de H^+ tiene lugar a través de procesos naturales como la nitrificación del nitrógeno amónico.

Existen varias estimaciones de la distribución mundial de los suelos ácidos (Figura 1.2). Los suelos ácidos ocupan 1.455 millones de hectáreas (11% de la superficie terrestre) según una estima realizada por Van Wambeke (1976). Sin embargo, Haug (1983) estimó que los suelos ácidos representaban entre 30-40% de la superficie cultivable y más del 70% de la potencialmente cultivable. Posteriormente, Von Uexkull y Mutert (1995) estimaron que la extensión global de los suelos ácidos (suelos con $\text{pH} < 5,5$) era de 3.950 millones de hectáreas, aproximadamente el 30% del total de la superficie mundial libre de hielos. Eswaran y col. (1997) apuntaron que el 26% de la superficie libre de hielos son suelos ácidos, estima que coincide bastante bien con la anterior.

Los suelos ácidos aparecen principalmente en dos zonas terrestres: la zona norte, con frío y clima templado húmedo, y la zona subtropical, con calor y condiciones húmedas (Von Uexkull y Mutert, 1995). La mayoría de los suelos ácidos son selvas y bosques (66,3% o 2.621 millones de hectáreas), mientras que el 17,7 % (699 millones ha) está cubierto por vegetación de estepa, pradera y sabana. Solamente 212 millones ha (5,4%) de suelos ácidos están sembrados (Von Uexkull y Mutert, 1995). Los suelos ácidos ocupan grandes extensiones de terreno potencialmente cultivable, que podrían utilizarse para reforestar y mejorar los pastos para producción animal, buenos ejemplos de

esta situación se dan en la sabana de Brasil, en Colombia, Venezuela, África central y sudeste Asiático (Bourlaug y Dowsell 1997).

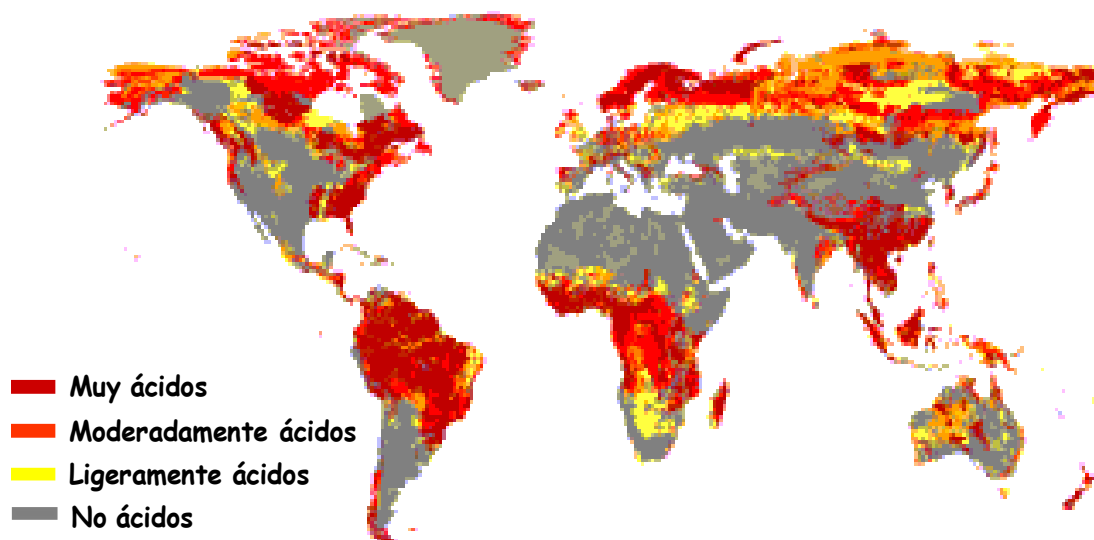


Figura 1.2. Distribución Mundial de los suelos

En Europa, los países escandinavos se encuentran entre las regiones más afectadas y en la Federación Rusa existen alrededor de 5 millones de hectáreas de suelo cultivable ácido. En Polonia, el 60% de la superficie cultivable está clasificada como ácida o muy ácida (Bogouszewski, 1980) y en Portugal el 80% de los suelos han sido definidos como ácidos (Almeida 1955). En España existen problemas de suelos ácidos en Galicia y Extremadura (Figura 1.3).

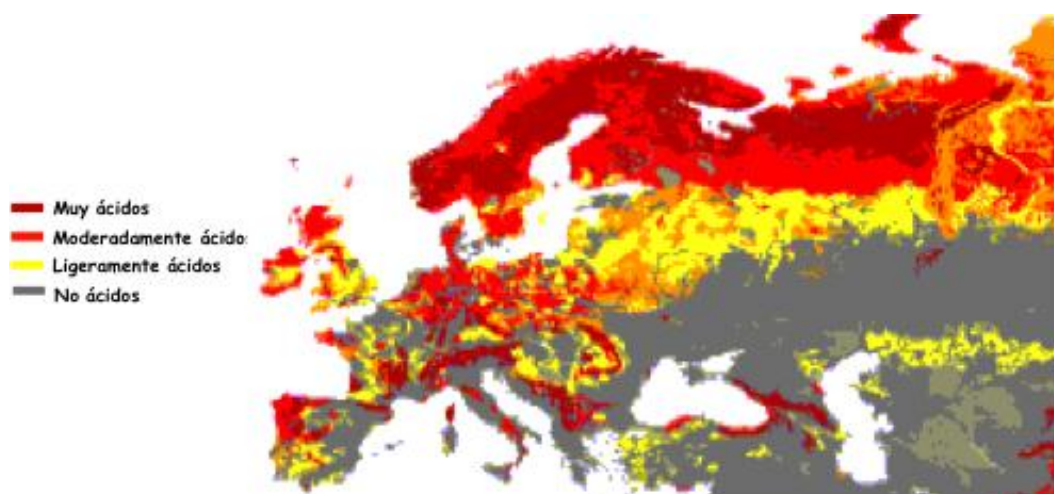


Figura 1.3. Distribución Europea de los suelos

El empleo de alcalinizantes (materiales con compuestos de Ca y Mg que neutralizan la acidez del suelo) disminuye la acidez del suelo y, por tanto, la toxicidad por Al^{3+} (Barber 1984). El material más empleado es la cal agrícola, procedente de piedras calizas como calcita (CaCO_3), dolomita (CaCO_3 , MgCO_3), o una mezcla de ambas. La cal se dispersa en la superficie y luego se mezcla con el suelo en las operaciones de mantenimiento (arado, etc). En agua, el CaCO_3 se disuelve y se hidroliza para formar iones OH^- que posteriormente pueden reaccionar con iones H^+ formados a partir de la hidrólisis del Al^{3+} (Thomas y Hargrove 1984). Otros materiales utilizados son marga, virutas de hierro y acero, polvo de chimeneas de cementeras, basura de diferentes tipos de fábricas (de remolacha azucarera, de papel, de carburo cálcico, de asilamientos térmicos de lana de roca y plantas depuradoras de agua); aunque su uso es escaso y en áreas próximas a su origen (Thomas y Hargrove 1984). Otros factores que disminuyen la acidez del suelo son la disponibilidad de NO_3^- y la consiguiente liberación de OH^- (que puede neutralizar parte de los iones H^+), la desnitrificación de NO_3^- y la volatilización del NH_3 . Los métodos prácticos que optimizan la eficiencia en el uso de nitrógeno, y reducen en último término la cantidad de NO_3^- pérdida por filtración, pueden disminuir la tasa de acidificación (Carver y Ownby 1995).

1.3 La Infertilidad De Los Suelos Ácidos:-

La solubilidad de los componentes del suelo y, por tanto, la disponibilidad de nutrientes está relacionada con el pH del suelo. Los suelos ácidos son poco fértiles y, por consiguiente, fitotóxicos debido a problemas nutricionales, deficiencias, o falta de disponibilidad de nutrientes esenciales tales como calcio, magnesio, molibdeno y fósforo, y toxicidad de aluminio, manganeso y actividad de H^+ (Figura 1.1) (Foy y col. 1978, Foy 1984, Carver and Ownby 1995, Jayasundara y col. 1998).

La toxicidad por Al es el principal factor limitante del crecimiento en suelos ácidos (Foy y col. 1978, Foy 1984, Carver and Ownby 1995, Jayasundara y col. 1998). El principal síntoma del estrés por Al es la inhibición rápida del crecimiento radicular (Figura 1.4) (Foy y col. 1978, Foy, 1984, Taylor 1988, Jayasundra y col. 1998).

Las raíces dañadas por Al son más pequeñas y quebradizas, su punta se vuelve más gruesa y de color marrón, aparecen muchas raicillas laterales y son poco eficientes absorbiendo nutrientes y agua (Foy y col. 1978). La

interacción del Al con la pared celular, la membrana plasmática y el simplasma de la raíz son algunos de los mecanismos que pueden producir estos efectos (Taylor 1988, Marschner 1991, Horst 1995, Kochian 1995). La zona terminal de 2 o 3 mm de la raíz (ápice y meristemo) es la zona crítica, la exposición al Al^{3+} de los 3 mm siguientes no produce una inhibición significativa del crecimiento (Ryan y col. 1993). Según Bennet y Breen (1991) el ápice de la raíz proporciona protección frente al Al^{3+} a través de su implicación en la percepción de la señal y distribución hormonal.

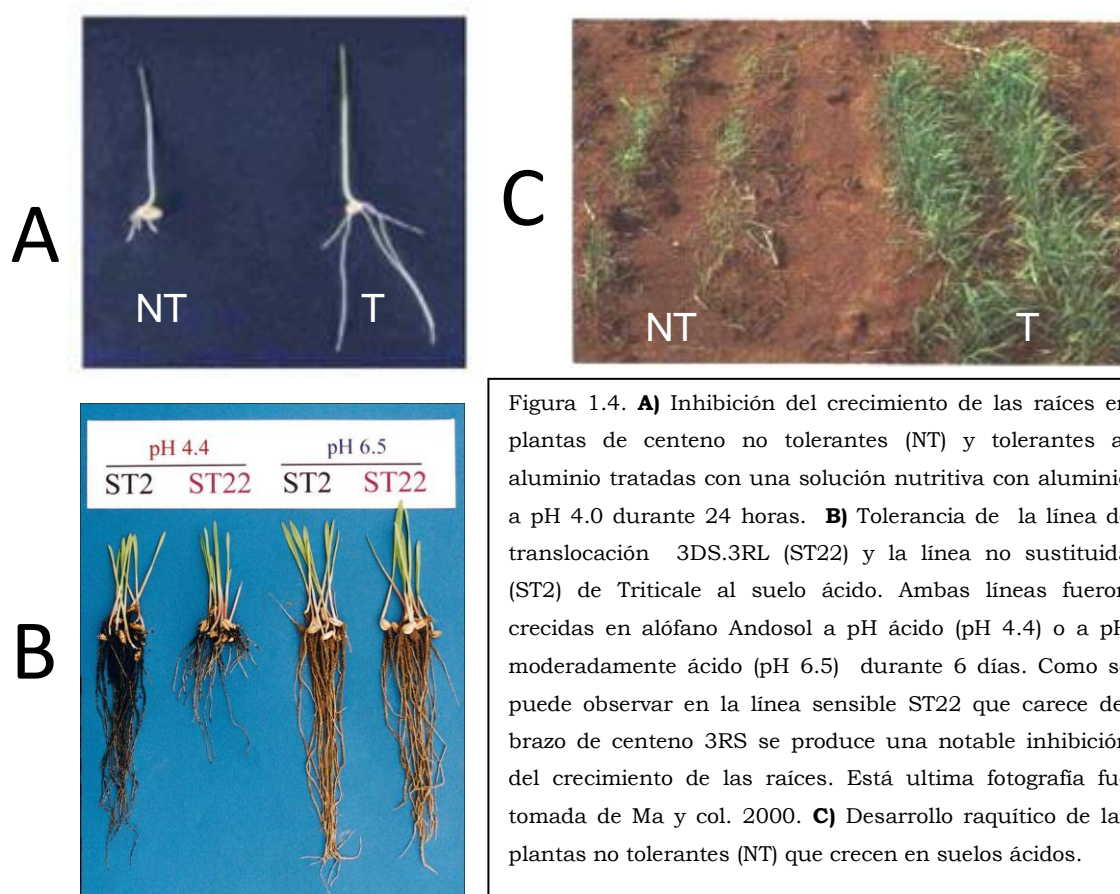


Figura 1.4. **A)** Inhibición del crecimiento de las raíces en plantas de centeno no tolerantes (NT) y tolerantes al aluminio tratadas con una solución nutritiva con aluminio a pH 4.0 durante 24 horas. **B)** Tolerancia de la línea de translocación 3DS.3RL (ST22) y la línea no sustituida (ST2) de Triticale al suelo ácido. Ambas líneas fueron crecidas en alófano Andosol a pH ácido (pH 4.4) o a pH moderadamente ácido (pH 6.5) durante 6 días. Como se puede observar en la línea sensible ST22 que carece del brazo de centeno 3RS se produce una notable inhibición del crecimiento de las raíces. Esta última fotografía fue tomada de Ma y col. 2000. **C)** Desarrollo raquítico de las plantas no tolerantes (NT) que crecen en suelos ácidos.

1.4 El Aumento De La Población Mundial:-

Las estimaciones de crecimiento de la población mundial indican que el número de habitantes se duplicará en el año 2050. El mantenimiento de las necesidades de la población y de la seguridad en la alimentación en ese momento, supondrán un enorme desafío durante los próximos años. Probablemente, la producción tendrá que duplicarse o, casi seguro, triplicarse para satisfacer a los 11 mil millones de habitantes que poblarán el planeta. De estos, aproximadamente el 90% vivirá en los países en desarrollo (Herrera-Estrella, 1999). Este desafío supondrá seguramente un aumento de los terrenos destinados a cultivo, siendo necesario utilizar terrenos que

actualmente no se usan y que sean potencialmente cultivables. Las estimaciones actuales indican que aproximadamente el 70% de los terrenos potencialmente cultivables son de tipo ácido. Por tanto, el conocimiento profundo de los mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia al estrés por Al y, el posterior desarrollo biotecnológico de variedades con genotipos tolerantes que puedan cultivarse en los países en desarrollo, son objetivos fundamentales de investigación y, de su éxito dependerá, en gran parte, el aumento de la producción necesario para satisfacer las necesidades futuras de la población.

Existe una gran variación del grado de tolerancia al aluminio en las diferentes especies vegetales. Algunas especies son inherentemente más tolerantes, por ejemplo: yuca (*Manihot esculenta* Crantz), caupí o chícharo salvaje (*Vigna unguiculata* L. Walp), cacahuete o maní (*Arachys hypogaea*), guandul (*Cajanus cajan* L. Millsp.), patata (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oryza sativa* L.) y centeno (*Secale cereale* L.) (Little, 1988). En la familia Triticeae, el centeno es la especie más tolerante seguido por Triticale (*X Triticosecale* Wittmack), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Mugwira y col. 1976, 1978, Aniol y Madej 1996).

El estudio del control genético de la tolerancia al aluminio, la identificación de genes candidatos, su localización cromosómica, el análisis de su expresión y el descubrimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia son objetivos fundamentales en diferentes especies de cereales de elevado interés agronómico. Sin embargo, también son objetivos importantes en otras especies relacionadas. La identificación de genes candidatos relacionados con la tolerancia, su localización y el estudio de su expresión en centeno, especie de la familia Triticeae con mayor grado de tolerancia, permitirá introducir dichos genes en especies de mayor importancia agronómica aunque menos tolerantes, como trigo y cebada, mediante la obtención de plantas transgénicas. De igual manera, la detección de marcadores moleculares estrechamente ligados a los genes de tolerancia permitirá introducir dichos genes en líneas, variedades y cultivares más sensibles mediante programas de selección asistida por marcadores. Sin las limitaciones que produce el estrés por Al, es posible obtener rendimientos significativamente superiores en los mismos terrenos cultivables y, además, se promocionaría la seguridad alimentaria, el desarrollo económico y se preservaría el ambiente (Hoekenga y Magalhaes, 2011).

1.5 Métodos Empleados Para Determinar El Grado De Tolerancia Al Aluminio:-

Los métodos para evaluar la tolerancia al Aluminio utilizados por los distintos autores son bastante variados: cultivo de células y tejidos (Corner y Meredith 1985), crecimiento en soluciones nutritivas (Baier y col. 1996), bioensayos en suelo (Stølen y Andersen 1978, Ring y col 1993) y evaluaciones en campo (Johnson y col. 1997). Los métodos de laboratorio e invernadero son los más utilizados ya que son rápidos, precisos, no destructivos y pueden aplicarse en estados tempranos de desarrollo. Sin embargo, las evaluaciones de campo son mucho más laboriosas (Craver y Ownby 1995).

El crecimiento en soluciones nutritivas en el laboratorio (Figura 1.5) es la técnica más empleada ya que proporciona un acceso sencillo a las raíces, permite controlar la disponibilidad de nutrientes, el pH y utilizar métodos de medida de la tolerancia no destructivos (Carver y Ownby 1995). Los métodos más utilizados para evaluar la tolerancia y clasificar las planta en tolerantes y sensibles son la tinción de las raíces con hematoxilina y el crecimiento de la raíces después del tratamiento con Al (Baier y col. 1995, Carver y Ownby 1995). También se ha utilizado para evaluar la tolerancia al Aluminio el peso seco de las raíces y de la parte aérea, el número de hijuelos y el número de espigas y flores por espiga (Mugwira y col. 1976, Manyova y col. 1988). También se ha descrito correlación entre la tolerancia al Aluminio y la inducción de síntesis de calosa (1,3- β -D-glucano) (Zhang y col. 1994, Basu y col. 1997, Horst y col. 1997). Además, los resultados obtenidos con soluciones nutritivas en el laboratorio han demostrado correlacionarse muy bien con los de campo, ya que las plantas clasificadas como tolerantes normalmente muestran un mejor comportamiento y características agronómicas adecuadas en suelos ácidos (Carver y col. 1988, Rajaram y Villegas 1990, Ruiz-Torres y col. 1992, Rengel y Jurkic 1993, Baier y col. 1995).

El método de tinción con hematoxilina (Figura 1.6) es una herramienta muy poderosa para evaluar la tolerancia sin necesidad de medidas cuantitativas laboriosas. La hematoxilina forma complejos con el Aluminio de los tejidos que ha sido inmovilizado en forma de AlPO_4 en la raíz o inmediatamente debajo de la superficie de la raíz (Ownby 1993). A medida que aumenta la cantidad de Al que entra en la raíz aumenta la intensidad de tinción con hematoxilina y disminuye la tolerancia al Al (a mayor tinción menos tolerancia) (Polle y col. 1978).

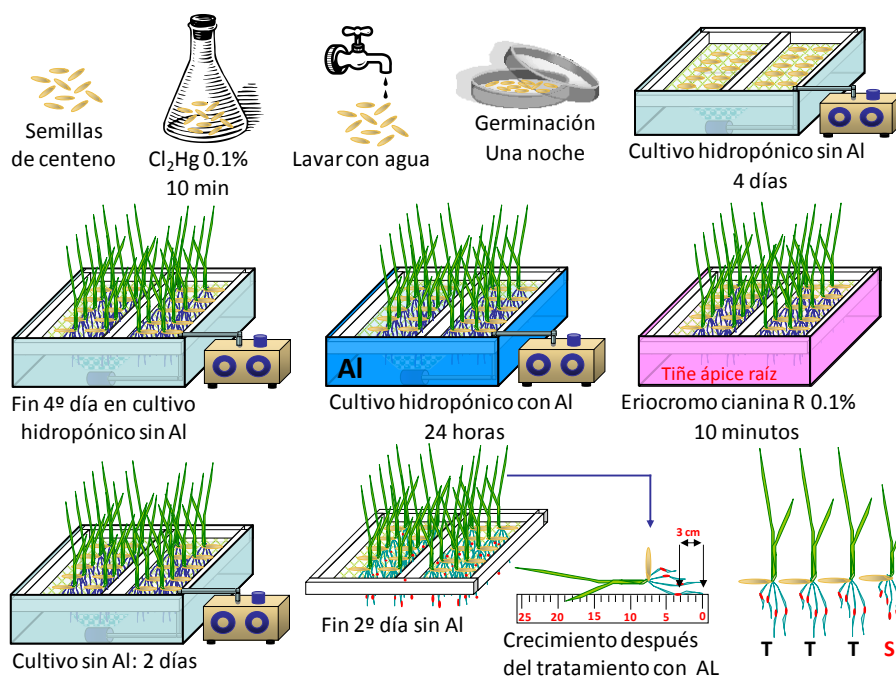


Figura 1.5. Método de evaluación de la tolerancia al aluminio basado la medición del crecimiento de las raíces después de un tratamiento con Al en una solución nutritiva a pH ácido (4.0) y tinción posterior con Eriocromocianina R.

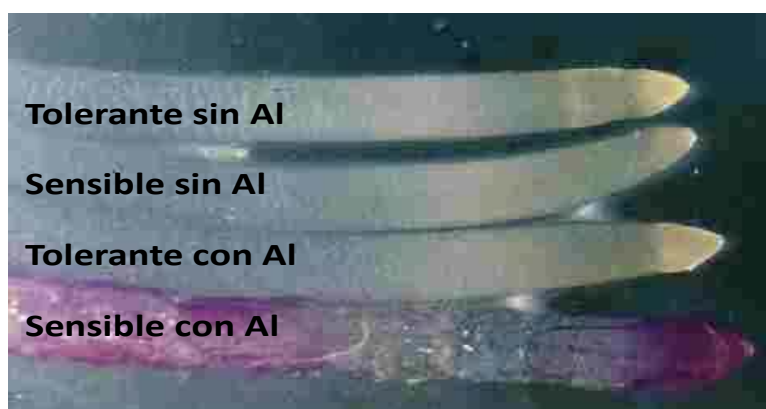


Figura 1.6. Tinción con hematoxilina para identificar genotipos tolerantes al Aluminio de trigo. Las plántulas de genotipos tolerantes y sensibles al Aluminio crecieron en 0,2 mM CaCl_2 sin Aluminio (las dos raíces de la parte superior) o con 50 μM de Al (las dos raíces de la parte inferior, la variedad sensible al Aluminio es la de la parte inferior) y luego se tiñeron con hematoxilina. La tinción Intensa de los ápices de la raíz sensible indica la acumulación de Aluminio en la punta de las raíces.

También es posible utilizar otros sistemas de tinción de las raíces que están estrechamente relacionados con la tolerancia (Figura 1.7). Los tratamientos con Aluminio producen un aumento de la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a una mayor formación de agua oxigenada (H_2O_2) cuya presencia puede detectarse empleando DCF-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato). Este aumento es mayor en las plantas sensibles. También se

produce una mayor peroxidación lipídica en las raíces de las plantas sensibles que puede evaluarse tiñendo las raíces con el reactivo de Schiff (Yin y col. 2010).

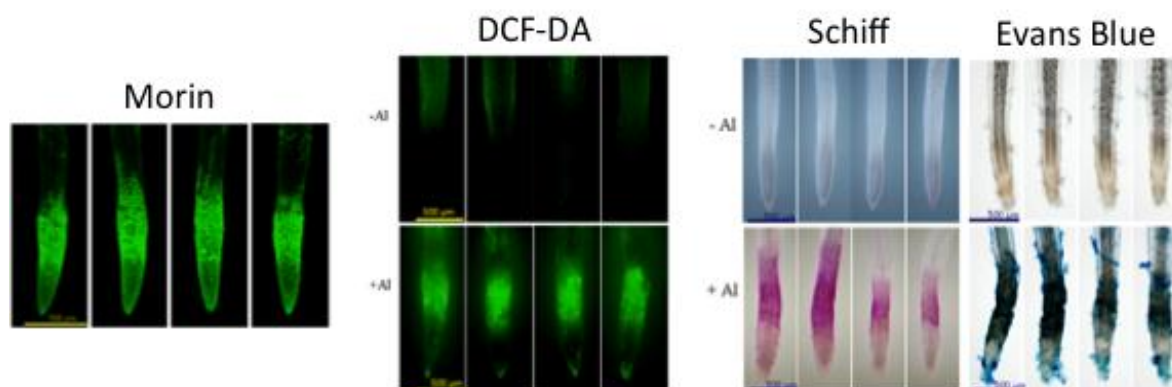


Figura 1.7. Tinciones de raíces de tabaco tratadas y sin tratar con Al con diferentes compuestos. Morín para detectar la acumulación de aluminio, DCF-DA para reconocer las zonas en las que se está produciendo agua oxigenada. El reactivo de Schiff para localizar la peroxidación lipídica y Evans Blue para ver muerte celular (Yin y col.2010).

La acumulación de Aluminio no solamente puede evaluarse mediante la tinción con hematoxilina, también puede estimarse empleando un compuesto fluorescente como el morín. Las raíces de las plantas sensibles muestran un mayor grado de fluorescencia al teñirse con morín. Los tratamientos con Aluminio a pH ácido suelen provocar la muerte celular en las raíces de las plantas sensibles y dicha muerte celular puede ponerse en evidencia tiñendo las raíces con Evans Blue. (Yin y col. 2010).

El método del crecimiento de la raíz habitualmente tiene en cuenta dos parámetros: el crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al (Baier y col. 1995) y el índice de tolerancia de las raíces que consiste en comparar el crecimiento después del tratamiento con Al y el crecimiento sin tratar. Ambos métodos tienen ventajas e inconvenientes, en el caso de la tinción con hematoxilina es necesario emplear la concentración adecuada de Aluminio según la especie estudiada (Hede y col. 2001). El crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al es una combinación de la tolerancia (genotipo tolerante) y del vigor de la raíz, y la mejor manera de separar ambos efectos es incluir en los experimentos controles sin tratar (Figura 1.8). También se han empleado métodos que combinan la hematoxilina y el crecimiento de las raíces. Todos estos sistemas han sido empleados en una gran variedad de estudios genéticos y moleculares.

Los parámetros que habitualmente se emplean para decidir si una planta es o no tolerante son el crecimiento de la raíz después del tratamiento con Aluminio y el índice de tolerancia.



Figura 1.8. Efecto del Al en el crecimiento de las raíces de genotipos de trigo que difieren en la tolerancia al aluminio en el locus *Alt1*. Las plántulas se cultivaron en una solución compuesta de 0,2 mM y 10 mM de CaCl_2 y de Al, respectivamente, durante 5 días. El genotipo tolerante al Al (a la derecha) manifiesta poco o ningún efecto del Al sobre el crecimiento, mientras que el sensible (a la izquierda) está severamente inhibido el crecimiento de la raíz.

El cultivo de células y tejidos puede ser una manera de evaluar la tolerancia al Aluminio, ya que la tolerancia se expresa a nivel celular (Taylor 1995), aunque este método ha sido poco utilizado, probablemente debido a la dificultad técnica de crecer células a pH bajo (Carver y Ownby 1995).

Los bioensayos en suelo no se realizan necesariamente en los suelos del área elegida para la producción, pero la evaluación en un suelo representativo del área elegida es un paso crítico intermedio después de las valoraciones en soluciones nutritivas y antes de las caras y tediosas evaluaciones en campo (Carver y Ownby 1995). Los bioensayos en suelo son mejores que las evaluaciones llevadas a cabo con soluciones nutritivas cuando la tolerancia puede estar influenciada por factores externos al suelo (Ring y col. 1993), sin embargo hay muy pocos ejemplos de su utilización.

Las evaluaciones en campo son el método más directo para valorar la tolerancia midiendo el rendimiento económico, normalmente se llevan a cabo dos réplicas: una en parcelas de suelo ácido y otra en parcelas tratadas con limo (Carver y Ownby 1995, Johnson y col. 1997). En las evaluaciones en campo los dos problemas más importantes son las infecciones por hongos patógenos (favorecidas por el bajo pH y la aplicación de limo) y la variación espacial del pH en la superficie y en las subcapas de suelo. Existen varios ejemplos de evaluaciones en campo, pero son muy caras y laboriosas (Stølen y Andersen 1978, Ruiz-Torres y col. 1992, Baier y col. 1995, Johnson y col. 1997)

2. La Tolerancia Al Aluminio:-

La rizotoxicidad por Al se produce cuando los cationes de Al (Al^{3+}) alcanzan las partes vulnerables de la raíz. La quelación del Al es un mecanismo común de detoxificación que puede realizarse en el exterior (exclusión del Al) o en el interior (quelación interna) de la raíz.

Los mecanismos de tolerancia al Al pueden dividirse en mecanismos que facilitan la exclusión del Al del ápice de la raíz (mecanismos externos o apoplásticos) y mecanismos que confieren la habilidad de tolerar el Al en el simplasma de la planta (mecanismos internos o simplásticos de tolerancia) (Taylor 1988, Carver and Ownby 1995, Kochian 1995). La mayoría de la investigación se ha centrado en el estudio de los mecanismos externos ya que se ha supuesto que la mayoría del Al de la raíz es apoplásmico y su penetración en el simplasma es en general muy baja. Sin embargo, se ha demostrado que del 50-70% del Al total está en el simplasma (Tice y col. 1992,) y llega aquí tan solo 30 minutos después de la exposición a Al (Lazof y col. 1994). Los mecanismos de tolerancia externos o apoplásticos más importantes son:-

- 1)** Exudación de ácidos orgánicos (Hue y col. 1986, Suhayda y Haug 1986, Miyasaka y col. 1991, Delhaize y col. 1993, Basu y col. 1994b, Ryan y col. 1995, Pellet y col. 1995, De la Fuente y col. 1997).
- 2)** Inmovilización del Al en la pared celular (Mugwira y Egawhary 1979, Blamey y col. 1990, Taylor 1991, Kochian 1995).
- 3)** Exudación de fosfato (Taylor 1991, Ryan y col. 1993, Pellet y col. 1997).
- 4)** Eflujo activo de Al a través de la membrana plasmática (Zhang y Taylor 1989, 1991, Taylor 1991).
- 5)** Producción de mucílago por las raíces (Horst y col. 1982, Henderson y Ownby 1991).
- 6)** Exclusión de Al a través de la alteración del pH de la rizosfera (Foy y col. 1965, Mugwira y col. 1976, Mugwira y Patel 1977, Foy 1988, Taylor 1988, Taylor 1991, Kochian 1995, Pellet y col. 1997).
- 7)** Permeabilidad selectiva de la membrana plasmática (Wagatsuma y Akiba 1989, Taylor 1991).

Los mecanismos de tolerancia internos o apoplásticos más importantes son:

- 1) Síntesis de proteínas de unión a Al (Aniol 1984b, Picton y col. 1991, Rincón y González 1991, Delhaize y col. 1991, Basu y col. 1994a, Somers y Gustafson 1995, Somers y col. 1996, Basu y col. 1997).
- 2) Quelación en el citosol.
- 3) Compartimentación en vacuolas.
- 4) Aparición de enzimas tolerantes a Al.
- 5) Actividad enzimática elevada (Taylor 1991).

El mecanismo de tolerancia más estudiado y comprendido hasta la fecha es la exclusión de Al que se basa fundamentalmente en ácidos orgánicos como málico, cítrico y oxálico que quelan el Al. En las vías relacionadas con málico y cítrico se han identificado varios genes como genes mayores candidatos de tolerancia, mientras que otras vías de exclusión de Al son menos conocidas y aún no se han identificado genes candidatos. La exclusión de Al por quelación requiere, en primer lugar, que se detecte el Al y que se sinteticen y transporten ligandos (ácidos orgánicos entre otros) que posteriormente serán exudados por la raíz. Los genes candidatos de tolerancia identificados hasta el momento pertenecen a la tercera categoría, es decir, están involucrados en el transporte de ligandos, fundamentalmente en el transporte de málico y de cítrico. El destino del Al en el interior de las raíces es de difícil estudio, casi inabordable, las plantas poseen como hemos mencionado mecanismos internos de tolerancia tales como la quelación del Al en el citosol, la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), modificaciones en la síntesis de lípidos o en las paredes celulares u otros mecanismos aún no conocidos o identificados. La exudación de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos de tolerancia más extendidos. En la (Tabla 1.1) se puede encontrar una relación de especies vegetales que exudan diferentes tipos de ácidos orgánicos en respuesta al estrés por Aluminio.

2.1 Control Genético De La Tolerancia Al Aluminio:-

La aplicación de cal agrícola puede disminuir la acidez en la zona superficial del suelo. Sin embargo, es una solución poco eficaz, ya que el efecto neutralizante se ejerce en los primeros 25 cm. del suelo y no afecta a zonas profundas, donde penetra gran parte del sistema radicular (Guedes-Pinto,

1985). Además, cuando las capas del subsuelo son ácidas, la mejora de la capa superficial no permite a las raíces penetrar la capa ácida y alcanzar los aportes de agua y nutrientes críticos más profundos. Por consiguiente, la obtención y selección de variedades de plantas con genotipos tolerantes al aluminio, por técnicas de mejora tradicional o mediante ingeniería genética, parece la mejor solución al problema.

Tabla1.1 Ácidos orgánicos (AO) exudados por las raíces de diferentes especies vegetales en respuesta al estrés por Aluminio.

AO exudado	Especie vegetal	Referencia
Cítrico	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Pellet y col. 1996
Cítrico	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Delhaize y col. 2001
Cítrico	Senna tora (<i>Cassia tora</i>)	Ishikawa y col. 2000
Cítrico	Soja (<i>Glycine max</i>)	Silva y col. 2001
Cítrico, Málico	Avena (<i>Avena sativa</i>)	Zheng y col. 1998
Cítrico, Málico	Centeno (<i>Secale cereale</i>)	Li y col. 2000
Cítrico, Málico	Triticale (<i>Triticale ssp</i>)	Ma y col. 2000
Cítrico, Málico	Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	Saber y col. 1999
Cítrico, Málico	Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	Zheng y col. 1998
Cítrico, Málico	Colza (<i>Brassica napus</i>)	Zheng y col. 1998
Cítrico, Málico	Leguminosa arbustiva (<i>Lespedeza bicolor</i>)	Dong y col. 2008
Cítrico, Málico, Aconítico	Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	Magalhaes y col. 2007, Goncalves y col. 2005
Málico, Cítrico	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Delhaize y col. 1993, Ryan y col. 2009
Málico, Cítrico	Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Kobayashi and Koyama 2002, Liu y col. 2009
Málico, Cítrico	Caupí (<i>Vigna unguiculata</i>)	Jemo y col. 2007
Oxálico	Taro (<i>Colocasia esculenta</i>)	Ma and Miyasaka 1998
Oxálico	Trigo sarraceno (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Zheng y col. 1998
Oxálico, Cítrico	Álamo o chopo temblón (<i>Populus tremula</i>)	Qin y col. 2007
Oxálico	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Begum y col. 2009

El estudio del control genético (número de loci y tipo de herencia) de la tolerancia y la localización cromosómica de los genes que la confieren ha sido, y es, un objetivo básico de investigación en cereales, especialmente en trigo. Para mejorar los Triticales y en los estudios de la manipulación cromosómica de trigo es clave conocer qué cromosomas de trigo, centeno y otros cereales poseen genes de Tolerancia al Aluminio (Aniol y Gustafson 1984).

2.1.1 Control Genético En Trigo:-

Slootmaker (1974) encontró que el genotipo D de trigo era el más importante, seguido por los genotipos A y B. Posteriormente, Aniol y Gustafson (1984) identificaron genes de tolerancia en los brazos cromosómicos 6AL, 7AS, 4BL, 2DL, 3DL, 4DL y 7D, confirmando que los genotipos D y A eran los más importantes. Más tarde, Aniol (1990) localizó genes que controlaban la tolerancia en los brazos 2DL, 4DL y 5AS. Kerridge y Kronstad (1968) encontraron un gen dominante responsable de la tolerancia en un cruzamiento entre dos variedades de trigo, Druchamp y Brevor. Sin embargo, Aniol (1984a) concluyó que había varios genes responsables de la Tolerancia al Aluminio en trigo. Según Lafever y Campbell (1978) y Campbell y Lafever (1981), la tolerancia no se hereda de forma sencilla, su expresión es aditiva y tiene alta heredabilidad, coincidiendo este resultado con lo descrito por Aniol (1984a). Camargo (1981) demostró que la tolerancia en el cultivar Atlas66 estaba determinada por un mecanismo genético complejo que implicaba al menos dos genes dominantes principales y quizás algunos genes menores. Previamente, se había identificado un gen en el cromosoma 5D, pero Berzonsky (1992) concluyó que la tolerancia en Atlas66 estaba determinada además de por genes dominantes del genotipo D, por genes de los genotipos A y/o B. Rajaram y col. (1991) mediante diferentes cruzamientos, explicaron la tolerancia con dos genes dominantes complementarios en un parental y un gen recesivo en otros dos parentales. Camargo (1984) también ha descrito herencia recesiva en trigo para la Tolerancia al Aluminio. Sin embargo, en trigo, trabajos más recientes indican que la tolerancia está controlada por un gen mayor dominante (Delhaize y col. 1993, Somers y Gustafson 1995, Somers y col. 1996, Riede y Anderson, 1996, Basu y col 1997). Hace poco que se han obtenido diversos marcadores moleculares ligados al gen de tolerancia *Alt_{BH}* localizado en el cromosoma 4DL (Riede y Anderson 1996, Luo y Dvorák 1996, Rodríguez-Milla y Gustafson 2001). El gen candidato responsable de la tolerancia al aluminio localizado en el brazo 4DL de trigo es un gen transportador de malato activado por Aluminio (*TaALMT1*) del que hablaremos más adelante en esta introducción. También se ha localizado posteriormente un *QTL* en el brazo 4BL de trigo que confiere tolerancia al Aluminio que sería responsable de la exudación de citrato (Ryan y col. 2010) y cuyo gen candidato sería un transportador de citrato activado por Aluminio (*TaMATE1*). De dicho gen también hablaremos más adelante en la introducción.

Los últimos resultados obtenidos en trigo mediante estudios de asociación genómica empleando una gran cantidad de cultivares y marcadores DArt, ponen de manifiesto la existencia de muchos loci distribuidos en diferentes cromosomas de trigo que contribuyen a la exudación de malato y que, explican una parte importante de la variabilidad para la tolerancia al aluminio en esta especie (Raman y col 2010). Estos resultados ponen de manifiesto de forma clara que la tolerancia al aluminio es un carácter cuantitativo controlado por muchos loci y están en consonancia con los previamente encontrados por Aniol (1984a), Aniol y Gustafson (1984), Lafever y Cambell (1978).

2.1.2 Control Genético En Centeno:-

El centeno es una de las especies más tolerante al estrés en la familia Triticeae (Little 1988) y varios estudios indican que el centeno es el cereal más tolerante al aluminio seguido del Triticale, el trigo y la cebada (Slootmaker 1974, Mugwira y col. 1976, Mugwira y col. 1978, Manyova y col. 1988, Aniol y Madej 1996, Hede y col. 2001).

Al igual que en otras especies, la Tolerancia al Aluminio en centeno parece presentar una herencia de tipo dominante (Aniol y Madej 1996). Mediante líneas de adición trigo-centeno y de sustitución/translocación, se ha determinado la existencia de genes que confieren tolerancia en los brazos cromosómicos 3RS (*Alt2*), 4RL (*Alt3*) y 6RS (*Alt1*) de centeno (Aniol y Gustafson, 1984, Ma y col., 2000; Aniol, 2004). Según Aniol (2004) el cromosoma que mayor tolerancia confiere es el 3R. Manyova y col. (1988) también han descrito genes en el cromosoma 5R. Mediante el análisis de descendencias que segregan para la Tolerancia al Aluminio se han detectado al menos tres loci independientes que confieren Tolerancia al Aluminio, uno en el brazo 4RL (gen *Alt3*), otro en 6RS (gen *Alt1*) y otro en 7RS (*Alt4*) (Gallego y Benito 1997, Gallego y col. 1998a, 1998b, Miftahudin y col. 2002, Matos y col. 2004, 2005). También, se ha descrito un *QTL* en el cromosoma 4R que explica el 48% de la variación fenotípica total y está ligado a un marcador RFLP a una distancia de 2 cM (Hede y col. 2001). En estos trabajos se han detectado diferentes tipos de marcadores moleculares (isoenzimas, RAPD, ISSR, RFLP, SCARs y SSR) estrechamente ligados a los genes de tolerancia.

Más recientemente, Benito y col. (2010) han detectado un marcador molecular ligado al gen *Alt3* de tolerancia en el brazo cromosómico 4RL y un *QTL* de tolerancia al aluminio, *QAlt5* en el brazo 7RS, ligado a otro gen que confiere

tolerancia, a un gen candidato de tolerancia al aluminio, gen *ScMATE1*, que codifica para un transportador de citrato activado por Al y que es ortólogo del gen de trigo *TaMate1* del cromosoma 4DL (Silva-Navas y col. 2011). Este *QTL* (*QAlt₅*) del brazo 7RS cosegrega con el gen *ScMATE1* (*ScAACT1*) que codifica para un transportador de citrato activado por Al. Este gen es ortólogo del gen *HvMate1* de cebada y del gen *TaMate1* de trigo del brazo 4BL.

Los resultados obtenidos hasta el momento por los diferentes autores indican que existen al menos un gen en el brazo 3RS, al menos otro en el brazo 4RL, uno más en el 5R, otro en el brazo 6RS y, por último, dos en el brazo corto del cromosoma 7R. En total, hay al menos siete loci que contribuyen de forma distinta a la tolerancia en centeno, indicando de nuevo estos datos que el carácter tolerancia al aluminio en centeno, es al igual que en trigo, un carácter cuantitativo controlado muchos loci.

2.1.3 Control Genético En Triticale:-

Los triticales tienen un alto grado de Tolerancia al Aluminio, mayor que la de trigo aunque inferior a la del centeno (Mugwira y col. 1976, Mugwira y col. 1978, Hede y col. 2001). Hay genes de trigo que silencian los genes de tolerancia de centeno y otros que permiten su expresión. Aniol y Gustafson (1984) demostraron que la tolerancia que confiere el cromosoma 6R de centeno depende del cromosoma de trigo por el que sea sustituido. Gustafson y Ross (1990) encontraron supresores de la tolerancia de centeno en los brazos cromosómicos de trigo 4AL, 5AL, 6AL, 7BS, 7BL y 3DS. También detectaron activadores de la tolerancia de centeno en los brazos 2AL, 5AS, 6BS, 1DS, 1DL, 2DL, 4DL, 5DS, 5DL, 6DL, 7DS y 7DL. Ma y col. (2000), mediante el empleo de diferentes líneas de sustitución y de translocación/sustitución trigo-triticales, encontraron que el brazo cromosómico 3RS confería Tolerancia al Aluminio pero no a metales como Cd, Cu y La. Estos autores concluyeron que los genes necesarios para la tolerancia en Triticale se encontraban en el brazo 3RS y que estaban implicados en la exudación de ácidos orgánicos (citrato y malato), ya que la cantidad exudada en la línea ST2 (no sustituida) era el doble que la observada en la línea ST22 (línea que contiene un cromosoma translocado constituido por el brazo corto del 3D y el largo del 3R) (Figura 8).

Recientemente mediante estudios de asociación con marcadores moleculares de tipo DArt se han construido mapas genéticos en Triticale y se han podido

detectar varias regiones de los cromosomas del genoma de centeno que contienen genes que confieren tolerancia al aluminio (Niedziela y col. 2012, en prensa). Las regiones que contribuyen a la tolerancia son las siguientes 3R, 4R, 6R y 7R. Estos datos de nuevo indican que la resistencia al estrés por Al es un carácter de tipo cuantitativo.

2.1.4 Control Genético En Cebada:-

La cebada es el cereal más sensible al aluminio. La tolerancia a suelos ácidos en cebada está controlada por un gen dominante (Stølen y Andersen 1978) con múltiples alelos (Minella y Sorrells 1992). Stølen y Andersen (1978) encontraron un gen dominante (*Ph_t*) en el cromosoma 4H relacionado con la tolerancia a la alta acidez del suelo. Reid (1971) encontró que la tolerancia en los cultivares Dayton y Smooth Awn 86 estaba controlada por un gen dominante (*Alp*). Minella y Sorrells (1997) localizaron el gen *Alp* en el cromosoma 4H lejos del centrómero, sugiriendo que la tolerancia al bajo pH (*Ph_t*) y la Tolerancia al Aluminio (*Alp*) estaban controladas por el mismo locus. En cebada se ha realizado un mapa de alta resolución del locus *Alp* de Tolerancia al Aluminio localizado en el brazo largo del cromosoma 4H (Reid 1970, Tang y col. 2000, Raman y col. 2002). En diversos trabajos se ha propuesto que el gen *Alt_{BH}* de trigo localizado en el brazo cromosómico 4DL, el gen *Alp* de cebada situado en el brazo 4HL y el gen *Alt3* de centeno ubicado en el brazo 4RL serían ortólogos. Sin embargo, como veremos más adelante, resultados recientes en cebada indican que el gen *Alp* no es ortólogo del gen *Alt_{BH}* de trigo. Además, el gen *Alt3* de centeno del cromosoma 4R tampoco puede considerarse el ortólogo del de trigo, ya que el brazo largo del cromosoma 4D de trigo no es homeólogo del brazo largo del cromosoma 4R de centeno. Sin embargo, el gen *Alt4* del brazo 7RS de centeno sería el ortólogo del gen *Alt_{BH}* de trigo, ya que el brazo corto del cromosoma 7R es en parte homeólogo del brazo largo del cromosoma 4D de trigo (Naranjo y Fernández-Rueda 1991, Devos y col. 1993, Naranjo y col. 1997, Devos y Gale 2000).

2.1.5 Control Genético En Avena:-

La avena junto con el centeno son los cereales más tolerantes. Estudios llevados a cabo en Brasil indican que la Tolerancia al Aluminio está controlada por uno o dos genes dominantes en avena (Sánchez-Chacón y col. 2000, Wagner y col. 2001, Oliveira y col. 2002). Nava y col. (2006) mediante líneas consanguíneas recombinantes (RIL) detectaron que la tolerancia estaba

controlada por un solo gen mayor dominante. En avena diploide se han descrito cuatro *QTLs* de Tolerancia al Aluminio, uno de ellos, situado en el grupo de ligamiento F, explica el 39% de la variación total observada y se ha propuesto que sería ortólogo del gen *Alt_{BH}* de trigo (4DL), del gen *Alp* de cebada (4HL) y del gen *ALMT2* de maíz (Wight y col., 2006). El gen *Alp* de cebada ya hemos comentado que no puede seguir considerándose ortólogo del de trigo.

2.1.6 Control Genético En Maíz:-

En maíz se han descrito genes de tolerancia al Al en los cromosomas 2, 6 y 10 (Brondani y Pavia 1996, Sibov y col. 1999).

2.1.7 Control Genético En Sorgo:-

En sorgo (*Sorghum bicolor*) mediante clonación posicional se ha identificado y secuenciado un gen mayor dominante, el gen *Alt_{SB}*, previamente localizado en la región terminal del cromosoma 3 (Magalhaes y col. 2004) y que ha resultado ser un gen que codifica para transportador de citrato activado por aluminio denominado *SbMATE* (Magalhaes y col. 2007). Además, se ha detectado la existencia de múltiples alelos en el locus *Alt_{SB}* que confieren niveles de tolerancia distintos (Caniato y col. 2007). Se ha propuesto que el gen *Alt_{SB}* sería ortólogo de un *QTL* que se ha descrito repetidas veces en el cromosoma 1 de arroz (Wu y col. 2000, Nguyen y col. 2001, 2002, 2003, Ma y col. 2001) y también del gen *Alt2* del brazo 3RS de centeno ya que el cromosoma 1 de arroz es homeólogo de los cromosoma del grupo 3 de trigo y estos a su vez del cromosoma 3R de centeno (Caniato y col. 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se han detectado en trigo, centeno y cebada los genes ortólogos del *SbMATE* de sorgo. El gen *SbMATE* de sorgo muestra una estructura en exones e intrones bastante distinta de la de los genes *TaMATE1* (trigo), *HvMATE1* (*HvAACT1*) (cebada) y *ScMATE1* (*ScAACT1*) (centeno) que también son transportadores de citrato activados por Aluminio.

2.1.8 Control Genético En Arroz:-

En arroz, se han localizado hasta once *QTLs*, encontrándose uno de los de mayor efecto en el cromosoma 3 (Nguyen y col., 2002; Nguyen y col., 2003). Dadas las relaciones de homeología existentes entre los cromosomas de arroz y trigo, se ha propuesto que este *QTL* del cromosoma 3 de arroz sería el ortólogo del gen *Alt_{BH}* del brazo 4DL de trigo (Wu y col. 2000, Nguyen y col. 2003). Recientemente, se ha visto que los polisacáridos (pectina,

hemicelulosas 1 y 2) de la pared celular están implicados en un mecanismo de exclusión del aluminio de las raíces de las plantas de arroz, aumentando el tratamiento con Aluminio la actividad de la pectin metilesterasa (PME) (Yang y col 2007).

2.1.9 Control Genético En *Arabidopsis*:-

Arabidopsis thaliana es una especie muy poco tolerante al estrés por Al, soportando concentraciones muy bajas de dicho metal. Por tanto, *Arabidopsis* es una especie sensible al estrés por Al. En *Arabidopsis* se han detectado loci mendelianos con herencia semidominante en los cromosomas 1 y 4 (Larsen y col. 1996, Larsen y col. 1998) además de diversos *QTLs* que explican un 40% de la variación total observada (Kobayashi y Koyama 2002, Hoekenga y col. 2003). Hace poco se han detectado dos *QTLs* en *Arabidopsis*, en los cromosomas 1 y 3, estando el del cromosoma 1 relacionado con la exudación de malato (Kobayashi y col. 2005). Recientemente, en *Arabidopsis* (dicotiledónea) se ha identificado el gen *AtALMT1* en el cromosoma 1 que sería ortólogo del gen *TaALMT1* de trigo (monocotiledónea) situado en el brazo 4DL (Hoekenga y col. 2006).

2.1.10 Control Genético En Alfalfa:-

En alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *coreulea*) se han detectado cuatro RFLP asociados con la Tolerancia al Aluminio, dos de los cuales estaban presentes en genotipos de alta tolerancia (Sledge y col. 2002). También se han descrito tres putativos *QTL* en los grupos de ligamiento LG I, LG II y LG III que explican el 38, 16 y 27% de la variación fenotípica, respectivamente (Narasimhamoorthy y col. 2007).

2.2 Base Molecular De La Tolerancia Al Aluminio:-

Como ya he indicado anteriormente existen distintos mecanismos internos y externos de Tolerancia al Aluminio. El mecanismo externo más estudiado y mejor descrito que explica la Tolerancia al Aluminio es la exudación de ácidos orgánicos en las raíces (malato, citrato y oxalacetato) que actúan como agentes quelantes del Al (Miyasaka y col. 1991, Delhaize y col. 1993, Ma y col. 2000, Ma y col. 2001).

Las raíces de las plantas tolerantes de trigo (*Triticum aestivum*) exudan malato, aunque recientemente también se han detectado cultivares que exudan

citrato, las de judía (*Phaseolus vulgaris*), cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), Cassia tora y soja (*Glycine max*) exudan citrato, el trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) y el taro o ñame (*Colocasia esculenta*) exudan oxalacetato. Algunas especies como avena (*Avena sativa*), centeno (*Secale cereale*), Triticale (híbrido trigo-centeno), colza (*Brassica napus*) y rábano (*Raphanus sativus*) exudan malato y citrato (Tabla 1.1).

Se han descrito dos patrones de exudación de ácidos orgánicos (Figuras 1.9 y 1.10). En el patrón de tipo I (constitutivo) la exudación de ácidos orgánicos comienza inmediatamente después de la exposición al aluminio. Por ejemplo, la exudación de malato en trigo y oxalacetato en trigo sarraceno comienza entre 15 y 30 minutos después de la exposición a Al (Ma y col. 2001). Esta exudación rápida sugiere que el aluminio activa un mecanismo preexistente que no necesita la inducción de nuevas proteínas. En este caso, el aluminio activaría un transportador de membrana plasmática para iniciar la exudación. En el patrón de tipo II (inducible) la exudación de ácidos orgánicos comienza varias horas después de la exposición al aluminio. Por ejemplo, en *C.tora* la máxima exudación tiene lugar a las 4 horas de exposición al aluminio, en centeno el aumento de la exudación comienza a partir de las seis horas de exposición al aluminio y la exudación va aumentando durante varias horas más alcanzando el máximo entre 20 y 24 horas después del inicio de la exposición (Figuras 1.9 y 1.10). En maíz parece que se dan ambos tipos de exudación de citrato, una rápida y otra tardía que aumenta durante 48 horas. El retraso en la exudación observado en el patrón de tipo II parece indicar que se necesita la inducción de proteínas que podrían estar implicadas en el metabolismo o en el transporte y exudación de ácidos orgánicos (AO).

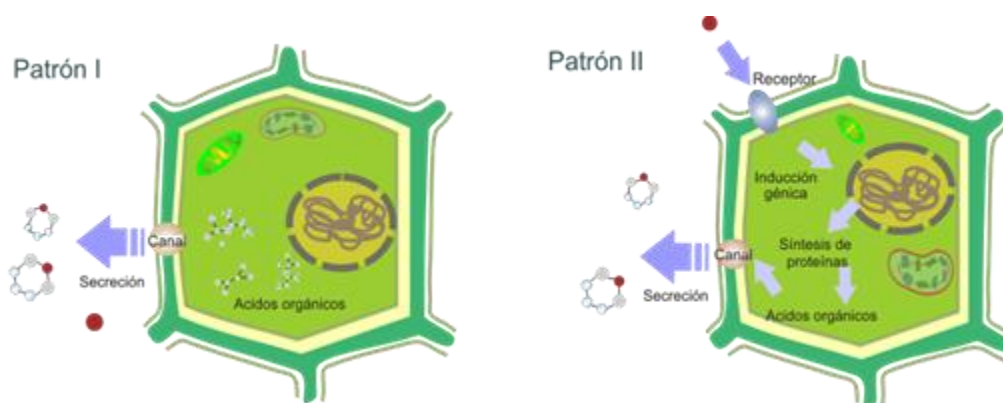


Figure 1.9. Patrones de exudación de ácidos orgánicos descritos en plantas. El círculo en rojo representa el catión trivalente de aluminio. **Patrón I** (constitutivo) en el que la exudación comienza de forma inmediata y **Patrón II** (inducible) en el que la exudación se inicia varias horas después de la exposición al estrés por Al.

Aunque el metabolismo de los AO puede cambiar en las plantas con patrón de tipo I, la capacidad de síntesis de AO no parece verse afectada por la exposición a Al. En trigo no se han detectado diferencias en las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, NAD-malato deshidrogenasa, citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente entre genotipos tolerantes y sensibles, tratados o sin tratar con Al. Sin embargo, en plantas con patrón de tipo II si se han observado cambios en la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de AO. Por ejemplo, en centeno la actividad de la citrato sintasa de las raíces aumenta un 30% después del tratamiento con Al mientras que las actividades de fosfoenolpiruvato carboxilasa, NAD-malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente no están afectadas. El aumento de actividad de citrato sintasa tiene lugar 6 horas después de la exposición a Al, justo antes del comienzo de la exudación de citrato por las raíces. Se han estudiado genes procedentes de microorganismos que confieren tolerancia a Al. Por ejemplo, el gen de citrato sintetasa de *Pseudomonas aeruginosa* se ha introducido en tabaco (De la Fuente y col., 1997) y papaya (López-Bucio y col., 2000). Las plantas transgénicas obtenidas fueron tolerantes y producían ácido cítrico en exceso. Sin embargo, en otros casos se han obtenido resultados contradictorios (Delhaize y col., 2001).

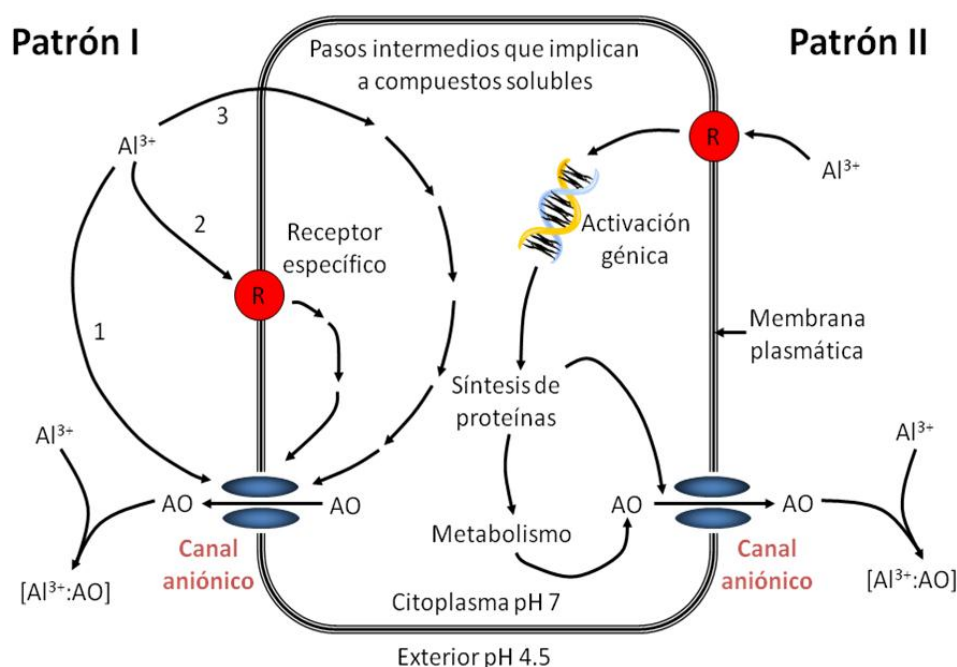


Figura1.10. Patrones de exudación de ácidos orgánicos (AO). **Patrón I:** el aluminio activa canales aniónicos de la membrana plasmática. **1-**El Al activa directamente el canal aniónico, **2-**El Al interacciona con un receptor específico (R) o con la membrana directamente y se inicia una segunda cascada de mensajeros que activa el canal, y **3-**El Al entra en el citoplasma y activa el canal directa o indirectamente. **Patrón II:** el Al interacciona con la célula, probablemente a través de una proteína receptora (R) que activa la transcripción de genes que codifican proteínas del metabolismo de AO o de su transporte a través de la membrana. Modificada de Ma y col. 2001.

Los AO también detoxifican el Al en el interior de la planta. Se conocen algunas especies muy tolerantes que acumulan grandes concentraciones de Al en la parte aérea de la planta. *Melastoma malabatricum*, especie de bosque tropical, acumula Al y su crecimiento se estimula por Al. Las hojas de *Fagopyron esculentum* (trigo sarraceno) acumulan 400 mg Kg⁻¹ de Al en peso seco después de un corto tratamiento con Al y 15.000 mg Kg⁻¹ de Al en peso seco cuando crecen en suelos ácidos. Las hojas de *Hydrangea* (hortensias) acumulan 3000 mg Kg⁻¹ de Al en peso seco después de varios meses creciendo en suelos ácidos y el color de los sépalos cambia del rosa al azul con el aumento de la concentración de Al (Ma y col. 2001) (Figura 1.11). El color azul de los sépalos de *Hydrangea* se debe a la formación de complejos entre compuestos orgánicos y Al (Figura 11), cerca del 80% del Al total de las hojas de *Hydrangea* se encuentra en forma soluble y la concentración en las vacuolas puede llegar a ser de 13.7 mM. Por tanto, las plantas que acumulan Al deben tener mecanismos internos para su detoxificación.

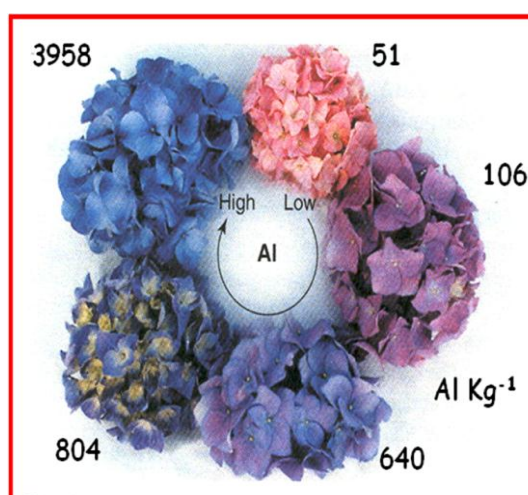


Figura 1.11. Color de los sépalos de *Hydrangea* (hortensias) con diferentes concentraciones de aluminio (Al). Las plantas de *Hydrangea* crecieron en una solución nutritiva ácida con o sin Al, o en suelos modificados con o sin Al. El color azul de los sépalos se debe a la formación de complejos entre delphinidin-3-glucósido, Al y ácido cafeoilquinico. La concentración de Al en los sépalos, desde los de color rosa a los de color azul en peso seco, es 51, 106, 640, 804 y 3959 mg Kg⁻¹, respectivamente. Modificada de Ma y col. 2001.

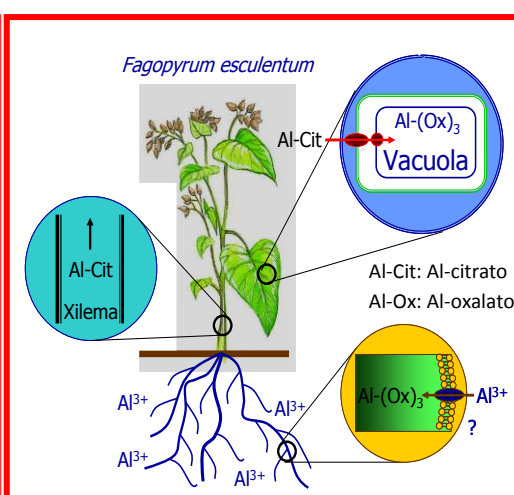


Figura 1.12. Entrada, transporte y acumulación de diferentes formas de Al^{3+} en *Fagopyron esculentum*. El Al^{3+} entra en las raíces por un mecanismo aún desconocido, luego se quelata formando complejos Al-oxalato (1:3) en las raíces, posteriormente pasa al xilema donde cambia de ligando formando complejos Al-citrato y, por último, llega a las hojas donde vuelve a formar complejos Al-oxalato y se acumula en las vacuolas. Modificada de Ma y col. 2001.

La detoxificación se consigue formando complejos de Al con ácidos orgánicos (Al-AO), quelando el Al. En *Hydrangea* se forma Al-citrato (1:1) y en

Fagopyron esculentum se forma Al-oxalato (1:3), siendo la estabilidad de estos complejos mayor que la del Al-ATP y previniendo la formación de complejos con otros componentes sensibles de la célula. En *Melastoma malabatricum* el Al se encuentra libre y formando complejos con oxalato en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3, los complejos con oxalato 1:1 y 1:2 son tóxicos para la célula y, posiblemente, se almacenan en la vacuola. En el trigo sarraceno (Figura 1.12) durante la entrada, transporte y acumulación del Al en la planta tienen lugar cambios en su forma química. Una vez que el Al^{3+} ha entrado en la planta, se quelata en las raíces formando complejos Al-oxalato (1:3), estos complejos pasan al xilema donde tiene lugar una reacción de cambio de ligando para formar complejos Al-citrato, en el paso del xilema a las células de las hojas, vuelve a producirse un cambio de ligando formándose complejos Al-oxalato que se almacenan en las vacuolas (Ma y col. 2001).

Recientemente se han aislado genes de Tolerancia al Aluminio en diferentes especies que codifican para proteínas de membrana que facilitan la exudación de ácidos orgánicos. Estas proteínas pertenecen a dos familias génicas, la familia ALMT (transportadores de malato activados por aluminio) y la familia MATE (exudación de toxinas y múltiples drogas). También se han descrito varios factores de transcripción relacionados con la tolerancia a aluminio y que son entre otras cosas necesarias para la expresión de los genes ALMT y MATE. En la (Tabla 2) se resumen algunos de los genes descritos hasta hace poco (2011) relacionados con el estrés por Al.

2.3 Exclusión De Al Mediante Exudación De Ácidos Orgánicos:-

2.3.1 A Través De Ácido Málico Y De Proteínas Transportadoras De Tipo ALMT1:-

2.3.1.1 Trabajos Llevados A Cabo En Trigo:-

Muchos de los descubrimientos relacionados con la investigación de la tolerancia al aluminio se han llevado a cabo en trigo, tanto de los mecanismos fisiológicos como de los mecanismos moleculares subyacentes. El primer gen de tolerancia al aluminio clonado en cualquier especie ha sido el transportador de malato activado por Al (referido como *TaALMT1*) (Sasaki y col. 2004). Su aislamiento se consiguió mediante secuenciación substractiva de una librería de ADNc obtenida a partir de las líneas casi isogénicas ET8 y ES8, que se diferencian en el locus *Alt1* localizado en el brazo largo del cromosoma 4D (Delhaize y col. 1993; Sasaki y col. 2004). *TaALMT1* identifica a una familia

génica que posee miembros en *Arabidopsis*, arroz y muchas otras especies de plantas (Sasaki y col. 2004).

Las proteínas ALMT implicadas en la resistencia al aluminio pertenecen a un amplio grupo de proteínas relacionadas que comparten un dominio UPF0005 (pfam01027) (Delhaize y col. 2007). Las 467 proteínas descritas con el dominio UPF0005 se encuentran en arqueas, virus, procariotas y eucariotas. Las proteínas de la familia ALMT se han definido como aquellas que tienen el dominio UPF0005, poseen entre 5 y 7 dominios transmembrana y no pertenecen a los grupos que contienen un inhibidor-Bax 1, un putativo péptido receptor de glutamato/aspartato y una putativa proteína asociada al receptor. Según esta definición, todas las proteínas ALMT son proteínas de plantas.

Tabla 1.2. Resumen de algunos de los genes involucrados en la tolerancia o resistencia al aluminio (Al^{3+}) en diferentes especies. Los genes se han agrupado en diferentes grupos. a) Genes de resistencia demostrada al Al^{3+} que explican parte de la variación genotípica, b) genes implicados en la resistencia basados en análisis mutacionales pero que hasta la fecha no explican la variación genotípica, c) Semejantes a los genes de resistencia al Al^{3+} que muestran homología con otros genes conocidos, con o sin análisis funcionales.

Especie	Gen	Función proteica	Evidencia	Referencia
Genes de resistencia al estrés por Al^{3+} que explican la variación genotípica				
Trigo	<i>TaALMT1</i>	Transportador de málico	Segregación, función	Sasaki y col. 2004
Arabidopsis	<i>AtALMT1</i>	Transportador de málico	Homología, función, mutación	Hoekenga y col. 2006
Sorgo	<i>SbMATE1</i>	Transportador de cítrico	Segregación, función	Magalhaes y col. 2007
Cebada	<i>HvAACT1</i> (<i>HvMATE1</i>)	Transportador de cítrico	Segregación, función	Furukawa y col. 2007
Centeno	<i>ScALMT1</i> <i>ScALMT1</i> cluster	Transportador de málico	Segregación, homología	Fontecha y col. 2007 Collins y col. 2008 Maron y col. 2010
Maiz	<i>ZmMATE1</i>	Transportador de cítrico	Segregación, función	
Genes de resistencia al estrés por Al^{3+} que no explican variación genotípica				
Arabidopsis	<i>AtMATE</i>	Transportador de cítrico – Exudación	Mutación	Liu y col. 2009
Arabidopsis	<i>AtSTOP1</i>	Factor transcripción dedos-Zn C_2H_2	Mutación	Iuchi y col. 2007
Arroz	<i>OsSTAR1</i> y <i>OsSTAR2</i>	Transportador UDP-glucosa	Mutación	Huang y col. 2009
Arroz	<i>ART1</i>	Factor transcripción dedos-Zn C_2H_2	Mutación	Yamaji y col. 2009
Arabidopsis	<i>ALS3</i>	Proteína parcial ABC – Función no clara	Mutación	Larsen y col. 2005
Arabidopsis	<i>ALS1</i>	Proteína parcial ABC – Función no clara	Mutación	Larsen y col. 2007
Arabidopsis	<i>AtSTAR1</i>	Proteína parcial ABC – Función no clara	Mutación	
Semejantes a los genes de resistencia al estrés por Al^{3+}				
Trigo	<i>TaMATE1</i>	Transportador de cítrico – Exudación	Segregación, homología (ni mutación ni datos función)	Ryan y col. 2009
Brassica napus	<i>BnALMT2</i>	Transportador de málico – Exudación	Segregación, homología (ni mutación ni datos función)	Ligaba y col. 2006
Centeno	<i>ScMATE2</i>	Transportador de cítrico – Exudación	Homología (ni mutación ni datos de función)	Yokosho y col. 2010
	<i>ScMATE1</i>	Transportador de cítrico	Segregación, homología (ni mutación ni datos función)	Silva-Navas y col. 2011

El primer gen de Tolerancia al Aluminio perteneciente a dicha familia, como ya hemos dicho, se identificó en trigos tolerantes, es un gen que codifica para un transportador de malato activado por Al^{3+} (*TaALMT1*) que al introducirse en cebada incrementa notablemente la tolerancia en este cereal (Delhaize y col. 2004, Sasaki y col. 2004). Este gen se ha localizado en el brazo 4DL de trigo (Raman y col., 2005). Además, se ha encontrado un *QTL* en trigo que está en la misma posición que el gen *TaALMT1* (Ma y col. 2005). La diferencia más importante entre los alelos de trigo se manifiesta a nivel de la expresión de *TaALMT1*, el alelo de la línea tolerante ET8 muestra unos niveles de expresión mayores que el alelo de la línea sensible ES8 (Sasaki y col. 2004). Análisis biofísicos demuestran que la proteína *TaALMT1* responde a la presencia extracelular de Al y se localiza en la membrana plasmática, siendo este resultado consistente con su identificación como un gen de tolerancia al aluminio (Sasaki y col. 2004, Yamaguchi y col. 2005). Los análisis fisiológicos de una colección de cultivares de trigo demostraron que la mayoría de las diferencias en la tolerancia al aluminio podrían explicarse por la cantidad de ácido málico exudado (Ryan y col. 1995). Esta fuerte correlación positiva sugería que las diferencias genéticas en la tolerancia al aluminio estaban concentradas en un solo mecanismo principal de tolerancia ($r^2=0,84$, exudación de ácido málico con respecto al crecimiento de la raíz) (Ryan y col. 1995). Los análisis moleculares posteriores de colecciones de germoplasma de trigo han reforzado las observaciones fisiológicas, la expresión del gen *TaALMT1* está altamente correlacionada con la exudación de ácido málico y con la tolerancia general al aluminio (Raman y col. 2005). Los análisis de las secuencias de las regiones promotoras han puesto de manifiesto diferencias estructurales importantes entre cultivares tolerantes y sensibles, detectándose seis haplotipos muy claros entre los cultivares que mostraban un amplio rango de tolerancia al aluminio (Sasaki y col. 2006, Raman y col. 2007). En la (Figura 1.13) se representa la estructura del gen *TaALMT1* de trigo.

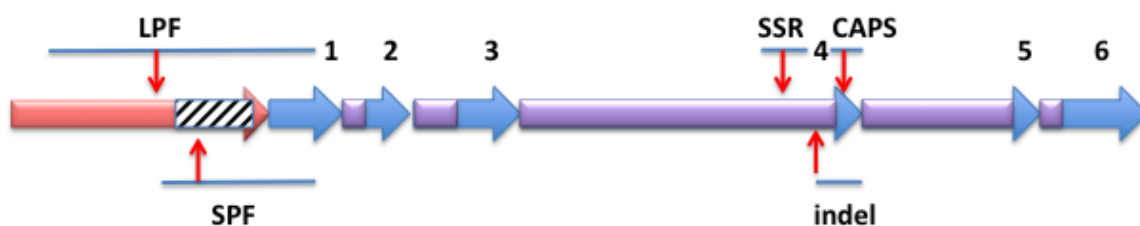


Figura 1.13. Estructura del gen *TaALMT1* adaptada de Raman y col. (2005, 2006, 2008). Las flechas azules indican los seis exones que están interrumpidos por cinco intrones (cajas de color violeta). LPF y SPF son los fragmentos largo y corto del promotor del gen *TaALMT1* (Sasaki y col. 2004, 2006). También se indica la localización de un motivo con SSR (intrón 3) y de SNPs en el exón 4 con flechas de color rojo.

Estos estudios han reafirmado la relación entre la exudación de ácido málico y la tolerancia al aluminio, estimada como el crecimiento relativo de la raíz ($r^2=0,88$ y $0,81$ obtenidos por Sasaki y col 2006 y Raman y col. 2007, respectivamente). La importancia de los diferentes motivos detectados en los haplotipos de los promotores no está todavía clara, pero se ha sugerido que uno o más motivos encontrados en los promotores con baja expresión han aumentado su número de copias y reordenado para derivar o dar lugar a promotores más potentes (Delhaize y col. 2007). Esta hipótesis es interesante debido a la similitud con las observaciones realizadas para el locus *Alt_{SB}* en Sorgo, pero obviamente requiere experimentación adicional. Aunque la expresión de *TaALMT1* es un factor importante para la tolerancia al aluminio, no es el único, las diferencias en la expresión génica explican solamente la mitad de las diferencias observadas en la tolerancia (Sasaki y col. 2006, Raman y col. 2007).

Existen múltiples evidencias genéticas que indican la existencia de otros factores, además de *TaALMT1*, que influyen en la tolerancia al aluminio. Los estudios de tolerancia en líneas ditelocéntricas del cultivar de trigo Chinese Spring indican que la pérdida de diferentes brazos cromosómicos disminuye la tolerancia (Papernik y col. 2001). La pérdida del brazo 4DL ocasiona una reducción del crecimiento de la raíz, de la exudación de ácido málico y aumenta la acumulación de Al en los ápices de las raíces, explicándose estos resultados por la pérdida del gen *TaALMT1* (Papernik y col. 2001). Sin embargo, la ausencia de los brazos cortos de los cromosomas 5A y 7A también reduce la tolerancia al aluminio de una forma similar, aunque no de una forma tan severa como la pérdida del brazo 4DL (Papernik y col. 2001). Por tanto, existen al menos tres factores en Chinese Spring que contribuyen a la exudación de ácido málico activada por aluminio. En segundo lugar, la transferencia incompleta de la tolerancia de Atlas66 hacia Chisholm (Chisholm-T) indica que hay muchos loci implicados en el alto grado de tolerancia observado en Atlas66 (Tang y col. 2002). La exudación de ácido málico en Chisholm-T es aproximadamente la mitad de la observada en Atlas66, a pesar de que la línea derivada Chisholm-T lleva el alelo *TaAMT1* de Atlas66 (Tang y col. 2002, Guo y col. 2007a). Chisholm-T muestra una expresión de *TaALMT1* superior a la observada en la línea isogénica sensible (Guo y col. 2007). No se han llevado a cabo estudios de RT-PCR o mediante otros métodos para comparar de forma directa Atlas66 y la línea derivada

Chisholm y, por tanto, es difícil saber en qué grado actúan factores cis y trans para determinar la expresión de *TaALMT1*. Sin embargo, está claro que se necesitan al menos dos loci para explicar las diferencias en tolerancia entre Atlass66 y Chisholm. Tercero, *TaALMT1* representa un *QTL* con un efecto grande en varias poblaciones utilizadas para construir mapas, pero no explica toda la variación observada (Raman y col. 2005). *TaALMT1* y los marcadores estrechamente ligados explican entre el 75 y el 93% de la variación para el carácter tolerancia en cinco poblaciones dobles haploides estudiadas (Raman y col. 2005). No se han llevado a cabo estudios genómicos a gran escala para detectar otros *QTL* menores que contribuyan para explicar la varianza genética restante, algunos autores sugieren la posible contribución de *QTL* menores en los brazos 5AS y 7AS. Sin embargo, el componente de la varianza debido a factores genéticos (la heredabilidad de la tolerancia al aluminio) en las poblaciones utilizadas para la construcción de mapas no se ha calculado. Es posible que la heredabilidad de la tolerancia al aluminio sea tan baja que *TaALMT1* explique, por sí solo, todas las diferencias determinadas genéticamente en la tolerancia al aluminio. Sin embargo, resultados recientes en trigo mediante estudios de asociación genómica empleando una gran cantidad de cultivares y marcadores DArt, ponen de manifiesto la existencia de muchos loci distribuidos en diferentes cromosomas de trigo (1A, 1B, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 5B, 6A, 6B, 7A and 7B) que contribuyen a la exudación de malato y que, explican una parte importante de la variabilidad para la tolerancia al aluminio en esta especie (Raman y col 2010). Algunos de estos cromosomas coinciden con los que contienen genes candidatos de tolerancias ya descritas y otros son nuevos.

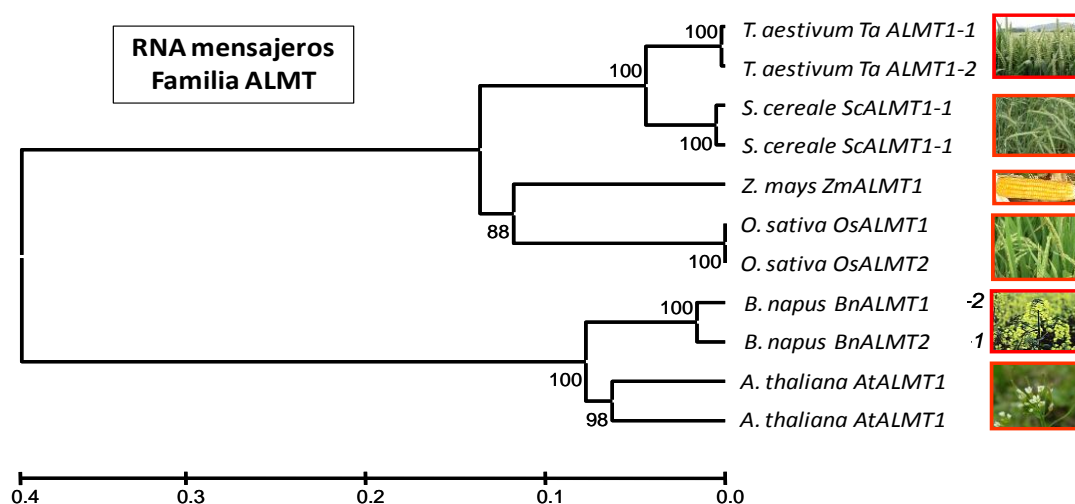
Otros factores relacionados con la tolerancia al aluminio en trigo pueden ser las fosfatasa o quinasas. La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo común que regula la actividad proteica y se sabe que representa un punto de control en muchas respuestas a diferentes tipos de estrés abiótico, tales como estrés salino, hídrico y por frío (Liu y col. 2000, Zhu 2001). La exudación de ácido málico en trigo se activa por Al, sin embargo, la expresión de *TaALMT1* no cambia (Sasaki y col. 2004, Raman y col. 2005). Este dato indica que la mayoría de la regulación de la exudación de Al ocurre a nivel de proteínas. Pre tratamientos cortos (30 minutos) de plántulas de trigo con el inhibidor de la proteína quinasa K-252a y estaurosporina reducen significativamente el flujo de ácido málico después de la exposición al

aluminio. Sin embargo, los pre tratamientos con KN-62, calfofina C y chelitrina no producen efectos (Osawa y Matsumoto 2001). De los inhibidores de fosfatasa solamente el ácido okadaico ha mostrado ser efectivo. El ácido okadaico y la estauroporina reducen la exudación de ácido málico entre el 30 y el 40% mientras que K-252a produce la abolición de la exudación de ácido málico en las plántulas tratadas (Osawa y Matsumoto 2001). Tal vez, los loci de los brazos 5AS y 7AS están implicados en estos procesos. Por tanto la fosforilación reversible juega un papel en la tolerancia al aluminio, el primer paso de la vía de exudación de ácidos orgánicos activada por Al.

Desde una perspectiva biológica básica, está claro que la investigación de la tolerancia al aluminio ha realizado grandes avances en trigo. Desde la perspectiva de la biología aplicada, merece la pena destacar dos estudios. Primero, el gen *TaALMT1* representa un *QTL* principal de tolerancia, teniendo información de este locus es posible llevar a cabo mejora de la tolerancia al aluminio asistida por marcadores. La sustitución de los análisis de fenotipos realizados en el campo por los análisis de genotipos moleculares de bajo coste puede acelerar de forma importante la mejora. Como resultado de la utilización de distintas fuentes de germoplasma y de los análisis concomitantes de las secuencias de ADN, se han obtenido marcadores de DNA específicos de haplotipo para alelos “elite” de *TaALMT1* que se pueden emplear en la selección asistida por marcadores (Raman y col. 2007). Como consecuencia los alelos que confieren una alta tolerancia podrán introducirse rápidamente en las variedades más interesantes (“elite”). Segundo, *TaALMT1* se puede utilizar para obtener plantas transgénicas con propósitos de mejora en especies con escasa tolerancia al aluminio y poca variación para este carácter. La cebada es una de las especies económicamente importantes y más sensibles al aluminio. Aunque se ha detectado cierto grado de variación entre los cultivares de cebada en la tolerancia al aluminio, la realidad es que la mayoría de los cultivares estudiados no son tolerantes (Tang y col. 2000). La introducción de *TaALMT1* en cebada produce un aumento grande de la tolerancia (Delhaize y col. 2004). Una concentración de 2µM inhibe un 50% el crecimiento de la raíz en los controles no transgénicos mientras que para conseguir el mismo nivel de reducción en una transgénica se necesita una concentración de 40µM (Delhaize y col. 2004). En plantas crecidas en suelo se

han observado resultados similares, aunque la eficacia de los transgénicos debe ser todavía evaluada en condiciones de campo.

TaALMT1 posee ortólogos en cebada, arroz, centeno (*ScALMT1*, Fontecha y col. 2007), avena (Wight y col. 2006) e incluso en especies vegetales de dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* (*AtALMT1*, Hoekenga y col. 2006) y *Brassica* (*BnALMT1* y *BnALMT2*, Ligaba y col. 2006). Por esta causa, se ha propuesto que forma parte de un mecanismo de tolerancia al Aluminio conservado en la Triticineas y en otras especies vegetales (Delhaize y col. 2007). En la (Figura 1.14) se muestra un dendrograma llevado a cabo con los RNA mensajeros de varios genes de la familia *ALMT*. Además, a partir de la secuencia del gen *TaALMT1* de trigo se han diseñado cebadores específicos que han permitido amplificar secuencias con similitudes con la secuencia de trigo superiores al 72% (Fontecha y col., 2007) y, posiblemente ortólogas, en diferentes especies como *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides*, *Avena sativa*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris*.



Kimura 2 parámetros, UPGMA, 10.000 réplicas

Figura 1.14. Dendrograma obtenido con algunos RNA mensajeros de la familia *ALMT* de diferentes especies. Se ha empleado el índice de Kimura 2 parámetros, el método de agrupamiento UPGMA y se han realizado 10.000 réplicas. Los valores de bootstrap son bastante elevados y se indican en las correspondientes bifurcaciones. La estructura de este dendrograma se mantiene igual cuando se utilizan otros índices moleculares (Jukes-Cantor, Tajima-Nei, Tamura 3-parámetros) y otros métodos de agrupamiento (Neighbor-Joining y Mínima Evolución).

2.3.1.2 Trabajos Realizados En *Arabidopsis*:-

Arabidopsis no tiene un alto grado de tolerancia al aluminio como el trigo (Larsen y col. 1996). Sin embargo, *Arabidopsis* es un sistema modelo excelente para análisis genético moleculares y fisiológicos de la tolerancia al aluminio. La baja tolerancia de *Arabidopsis* se debe principalmente a la exudación de

ácido málico activada por Al y ambas especies, trigo y *Arabidopsis*, comparten al menos una proteína homóloga (Hoekenga y col. 2003, Hoekenga y col. 2006). La disposición de un genoma bien analizado y mutagenizado con multitud de otros recursos genómicos hace que los estudios de *Arabidopsis* sean complementarios a los realizados en trigo.

TaALMT1 define una familia génica en *Arabidopsis* con más de una docena de miembros (Hoekenga y col. 2006). De estos genes de *Arabidopsis* semejantes a *ALMT* (denominados como *AtALMT*), el gen *AtALMT8* es el más parecido. Esta familia génica muestra un patrón diverso de expresión génica según las bases de datos públicas de expresión génica, múltiples genes *AtALMT* se expresan esencialmente en cada tejido analizado (Meyers y col. 2004, Kilian y col. 2007). Sin embargo, los análisis de mutantes indican que solamente *AtALMT1* es esencial para la respuesta a la tolerancia al aluminio (Hoekenga y col. 2006). Un mutante “knockout” *AtALMT1* pierde la exudación de ácido málico activada por Al, pero es capaz de exudar ácido málico en condiciones de estrés de bajo pH y fosfato indicando que un segundo gen *AtALMT* se activa en estas nuevas condiciones (Hoekenga y col. 2006). Un tercer locus, *AtALMT9*, codifica un transportador de malato vacuolar, que se expresa en casi todas las células de la planta (Kovermann y col. 2007). *AtALMT9* tiene una pequeña respuesta biofísica a la presencia de Al medida en experimentos de expresión heteróloga en oocitos, sugiriendo que las proteínas *AtALMT* relacionadas comparten múltiples aspectos funciones (Kovermann y col. 2007). Por consiguiente, hay una especialización funcional clara para los miembros de la familia *AtALMT*, incluso aunque el papel de sólo dos miembros de la familia haya sido identificado.

La exudación de ácidos orgánicos en respuesta al estrés por Al puede clasificarse como inmediata (patrón I) o inducible (patrón II) (Ma y col. 2001). El trigo muestra un patrón de tipo I que es consistente con la expresión constitutiva del gen *TaALMT1* y con la respuesta al aluminio a nivel de proteína (Sasaki y col. 2004). *Arabidopsis* tiene un patrón de tipo II que es consistente con una fuerte inducción de *AtALMT1* por estrés con Al, mientras también se responde a nivel de proteína (Hoekenga y col. 2006). La fosforilación proteica está implicada en la regulación de *AtALMT1* como lo está en la de *TaALMT1* (Kobayashi y col. 2007). El inhibidor de la proteína quinasa K-252a elimina la exudación de ácido málico activada por Al en *Arabidopsis*, al igual que lo observado en trigo. La expresión de *AtALMT1* se potencia con el

tratamiento con K-252a, sugiriendo que este compuesto actúa a nivel de proteína restringiendo la exudación de malato (Kobayashi y col. 2007). Como en trigo, la estaurosporina (un inhibidor de quinasas) y calcyculina A (un inhibidor de fosfatasas) también reducen el flujo de malato en plantas de *Arabidopsis* tratadas con Al, la expresión de *AtALMT1* no aumenta con ninguno de estos tratamientos, sugiriendo que la fosforilación reversible actúa tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional para regular *AtALMT1* (Kobayashi y col. 2007). La fosforilación reversible también es importante en la inactivación de *AtALMT1*. Los experimentos en los que las plantas se pasan de una solución con Al a otra sin Al demuestran que el flujo de malato se inactiva rápidamente en *Arabidopsis* (Kobayashi y col. 2007). El co-tratamiento con calcyculina A previene la inactivación de *AtALMT1*, el flujo de malato se mantiene tan alto como en las plantas tratadas. Podría ser interesante saber si *TaALMT1* también requiere fosfatasas para la inactivación de su función de transporte. No se conoce ninguna quinasa o fosfatasa implicada en la regulación de *AtALMT1*. Sin embargo, la expresión génica de WAK-1, una quinasa asociada a la pared se induce rápidamente (20 minutos) por tratamiento con Al. La sobre-expresión de esta quinasa puede también aumentar de forma modesta la tolerancia al aluminio in *Arabidopsis* transgénicas, pero aún no se ha establecido una conexión directa con *AtALMT1* (Sivaguru y col. 2003).

El estrés por pH bajo y otros metales tóxicos pueden inducir la expresión de *AtALMT1* en bajo grado (5-20%) comparada con la inducción por Al. Sin embargo, estos tratamientos no activan *AtALMT1*, lo que habla de la especificidad de la respuesta al estrés por Al (Kobayashi y col. 2007). Es posible imaginar coincidencias en la rizotoxicidad entre Al y erbio o lantano, sin embargo, los análisis genéticos indican que los procesos de tolerancia son distintos (Kobayashi y col. 2007). La respuesta a pH bajo y al estrés por Al tienen algún grado de solapamiento, que no es inesperado ya que la toxicidad por Al tiene lugar a bajo pH. La tolerancia a protones y al aluminio puede separarse experimental y genéticamente (Ikka y col. 2007, Iuchi y col. 2007). Esta falta de concordancia entre la tolerancia al estrés debido a protones y por Al se obtuvo hace varios años en maíz, y la identificación de *STOP1* en *Arabidopsis* ha dado sugerencias sobre los mecanismos moleculares subyacentes implicados (Poschenrieder y col. 1995, Iuchi y col. 2007). *STOP1* es un factor de transcripción necesario para la respuesta de tolerancia al

estrés por protones, la expresión de *AtALMT1* requiere la presencia de *STOP1* (Iuchi y col. 2007). Los mutantes nulos para *STOP1* son hipersensibles al estrés por protones, pero son también susceptibles a la toxicidad por Al a dosis en las que no se altera el crecimiento de las plantas normales (Iuchi y col. 2007). No está aún claro si *STOP1* activa la transcripción de *AtALMT1* directa o indirectamente (por ejemplo, actuando en un nivel regulador anterior), pero este descubrimiento es interesante si tenemos en cuenta el número de especies vegetales económicamente importantes que han sido clasificadas en el patrón II de exudación de ácidos orgánicos. Así como los genes tipo *ALMT1* están presentes entre las monocotiledóneas y las dicotiledóneas, quizás también los factores de transcripción del tipo *STOP1* se encuentren en ambos tipos de especies (Magalhaes 2006).

2.3.1.3 Resultados Obtenidos En Centeno:-

La exudación de ácido málico activada por Al se ha encontrado en otras especies además de trigo y *Arabidopsis* (Kochian y col. 2004). Aunque la mayoría de los avances en la exudación de malato activada por Al se han llevado a cabo en estas dos especies, varios no se han realizado en ellas.

El centeno además de exudar ácido málico por las raíces en respuesta al aluminio, también exuda ácido cítrico. El centeno se encuentra entre los cereales más tolerantes al aluminio tal vez la exudación de ambos ácidos orgánicos contribuye a su protección y puede ser explotada como un objetivo para la mejora de plantas. El transportador de malato implicado en la tolerancia ha sido identificado como *ScALMT1* (Fontecha y col. 2007) y también un posible transportador de citrato activado por Al denominado *ScMATE1* o *ScAACT1* (Silva-Navas y col. 2011). Teniendo en cuenta que se han identificado ambos transportadores, probablemente se puedan realizar progresos en centeno, caupí, soja y otras especies con el objetivo de incrementar la tolerancia al aluminio mediante selección asistida por marcadores o mediante biotecnología.

El gen *ScALMT1* de centeno está constituido por cinco intrones (dos inusualmente grandes, en especial el intrón 4) y seis exones y da lugar a un RNA mensajero de 1332 pb que codifica para una hipotética proteína hidrófoba de 452 aminoácidos y seis regiones transmembrana (Fontecha y col. 2007) (Figura 1.15).

Los datos de expresión de *ScALMT1* indican que solamente se induce en presencia de Al en el ápice de las raíces de plantas tolerantes y sensibles. La expresión del gen *ScALMT1* de centeno es cinco veces menor en el ápice de las raíces de la línea sensible (Riodeva) que en el cultivar tolerante (Ailés) (Fontecha y col. 2007). El gen *ScALMT1* se comporta como totalmente ligado (no se han encontrado recombinantes en tres F₂ con más de 350 descendientes) al locus *Alt4* previamente localizado en el brazo 7RS de centeno por Matos y col. (2005) (Figura 1.13). Por tanto, estos resultados indican que el gen *Alt4* (*ScALMT1*) de tolerancia al Al localizado en el brazo 7RS es un transportador de malato activado por Al.

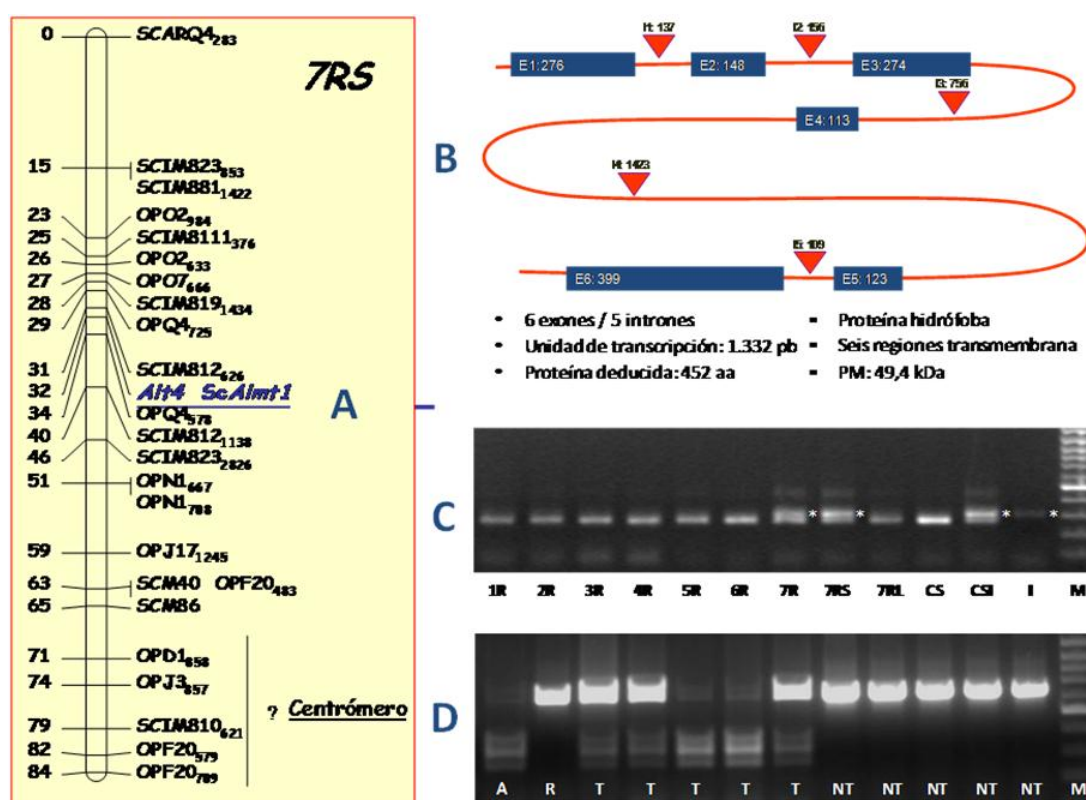


Figura 1.15. **A)** Mapa del cromosoma 7R. El locus *Alt4* y el gen *ScALMT1* ocupan la misma posición y están ligados a otros marcadores moleculares localizados en el brazo 7RS (SCM: microsatélites e intermicrosatélites de *S. cereale*, OP: RAPD). **B)** Estructura en intrones y exones del gen *ScALMT1* de *S. cereale*. **C)** Localización cromosómica del gen *ScALMT1* en el brazo 7RS de centeno. 1R a 7R: líneas de adición disómicas trigo-centeno, 7RS y 7RL: líneas de adición ditelocéntricas trigo-centeno, CS: trigo hexaploide parental (*Triticum aestivum* cv. "Chinese Spring"), I: centeno parental (*Secale cereale* cv. "Imperial"), CSI: Híbrido trigo centeno (anfiploide "Chinese Spring-Imperial") con todos los cromosomas de trigo y todos los de centeno. El asterisco indica el fragmento del gen *ScALMT1* localizado. **D)** PCR-RFLP (amplificación y posterior digestión con BspHI) de un fragmento del gen *ScALMT1* en 10 plantas de una F₂ de centeno en la que también segregaba el locus *Alt4*. El fragmento se comporta como totalmente ligado al locus *Alt4*. A: parental tolerante "Ailes", R: línea consanguínea parental no tolerante "Riodeva", T: plantas tolerantes de la F₂, NT: plantas no tolerantes de la F₂, M: marcador de peso molecular.

Sasaki y col. (2004) y Raman y col. (2005) han encontrado que la resistencia a Al de dos líneas isogénicas que poseen alelos que se diferencian en seis bases nitrogenadas y dos aminoácidos no está condicionada por estos alelos pero sí por el nivel de expresión del gen *TaALMT1*. Estos resultados indican que en

algunos casos la tolerancia al Al puede deberse a cambios en la conformación de la proteína, mientras que en otros, podría estar regulada por diferencias en las regiones promotoras (situadas « aguas arriba ») que controlarían la expresión de los genes *ALMT1*. Sasaki y col. (2006) han analizado las regiones promotoras (« aguas arriba ») de 69 líneas de trigo y han encontrado una gran variabilidad en esta región (seis patrones distintos) con bloques de secuencias duplicados o triplicados en diferentes órdenes. El número de repeticiones en esta región parece estar correlacionado en cierta medida con la exudación de malato en las líneas. Sin embargo, dicha correlación no se mantiene en las líneas procedentes de Japón. Raman y col. (2006) han estudiado la variación en el intrón 3 del gen *TaALMT1* de trigo en 20 genotipos de trigo encontrado marcadores repetitivos (inserciones y deleciones, INDEL) que cosegregan con la Tolerancia al Aluminio y que son extremadamente útiles en programas de selección asistida por marcadores y en estudios de evolución.

Collins y col (2008) han encontrado varias copias del gen *ScALMT1* en centeno, el cultivar tolerante (M39A-1-6) posee cinco copias en tándem y el sensible (M77A-1) dos copias. Tres de las copias, dos del cultivar tolerante (*ScALMT1-M39.1* y *ScALMT1-M39.2*) y otra del cultivar sensible (*ScALMT1-M77.1*) se expresan de forma muy intensa en los ápices de las raíces y se inducen por Al. También se han observado formas alternativas de procesamiento en dos de los genes de *ScALMT1*, estando una de ellas correlacionada con una inserción de 400 pb en un intrón. Sin embargo, los resultados obtenidos por Fontecha y col. (2007) mediante Q-RT-PCR indican que el número de copias del gen *ScALMT1* es mayor en la línea consanguínea sensible Riodeva (entre cuatro y cinco copias) que en el cultivar tolerante Ailés (dos copias).

2.3.1.4 Resultados En Otras Especies:-

En primer lugar, la colza (*Brassica napus*) se ha descrito en algunas ocasiones como una planta que exuda ambos ácidos orgánicos, málico y cítrico en respuesta al estrés por Al (Zheng y col. 1998). Este resultado parece ser específico de cultivar más que función del diseño experimental. La exudación de ambos ácidos orgánicos también se ha descrito en centeno (*Secale cereale*), en caupí o frijol chino (*Vigna unguiculata*) y soja (*Glycine max*) (Li y col. 2000, Silva y col. 2001, Jemo y col. 2007).

En segundo lugar, el aumento del número de transportadores de ácidos orgánicos y la interferencia en las rutas de transducción de señal produce

claros efectos en la exudación de ácidos orgánicos. Es conveniente recordar que el proceso de exudación de ácidos orgánicos puede dividirse en tres partes: percepción del Al, síntesis de ligandos y transporte fuera de la raíz. La primera y la tercera parte de este proceso puede alterarse claramente y afectar a la tolerancia al aluminio. Mediante la manipulación de la segunda parte de este proceso, el sistema de ácidos orgánicos, es mucho menos factible alterar la tolerancia al aluminio (Hoekenga y col. 2011). Se han obtenido resultados en alfalfa (*Medicago sativa*) empleando malato deshidrogenasa y en colza con citrato sintasa (Tesfaye y col. 2001, Anoop y col. 2003). Sin embargo, la sobre-expresión de citrato sintasa ha dado lugar a resultados inconsistentes en transgénicos de *Nicotiana* (de la Fuente y col. 1997, Delhaize y col. 2001). Las necesidades de ácidos orgánicos en el interior de la célula pueden o no ser limitantes para la eficacia de la respuesta al estrés por Al. En maíz, en el que las tasas de exudación de ácidos orgánicos varían de unos cultivares a otros, no se han observado cambios en los niveles de ácidos orgánicos que puedan correlacionarse con una tolerancia diferencial al aluminio (Pineiros y col. 2005). De hecho, la eficacia de la sobre-expresión de *TaALMT1* en cebada podría significar que las necesidades de ácidos orgánicos no deberían ser una limitación para la tolerancia (Delhaize y col. 2004). Sin embargo, está claro que deben producirse cambios en la regulación de los niveles internos de ácidos orgánicos ya que las plantas tolerantes de trigo exudan 10 veces más ácido málico que las sensibles. Tal vez, con estudios más cuidadosos y sistemáticos de las interacciones entre la percepción de Al, la síntesis de ligandos y su exudación puedan encontrarse patrones que nos indiquen de forma más clara como manipular y mejorar estos procesos para mejorar la tolerancia al estrés por Al.

2.3.2 A través de ácido cítrico y de proteínas transportadoras de tipo *Alt_{SB}* y de tipo MATE:-

2.3.2.1 Trabajos Realizados En Sorgo:-

Se han propuesto varios mecanismos fisiológicos de tolerancia al aluminio, pero la eficacia agronómica para promover estabilidad en el rendimiento en suelos ácidos permanece como el más desconocido. La excepción más clara es la utilidad de la exudación de ácidos orgánicos por los ápices de las raíces inducida por Al, que es sin lugar a dudas el principal mecanismo que permite la agricultura en suelos ácidos en los que el Al es tóxico. La mejora de la cebada con *TaALMT1* por transformación ilustra esta idea, pero solamente

como prueba de este concepto (Delhaize y col. 2004). Un gran ejemplo de la eficacia de mejorar la tolerancia al aluminio en plantas cultivadas es el descubrimiento y caracterización del principal gen de tolerancia en sorgo, *Alt_{SB}* (Magalhaes y col. 2007). El cultivar SC283 es el cultivar estándar más conocido en sorgo y ha mostrado repetidamente un comportamiento agronómico superior en suelos ácido (Duncan y col. 1983, Duncan 1988). Además, empleando cultivos hidropónicos mejor que observaciones basadas en el campo, la tolerancia en el cultivar SC283 ha mostrado estar ampliamente bajo control de un solo gen semi-dominante, *Alt_{SB}*, que se ha localizado en una región del cromosoma 3 de sorgo (Magalhaes y col. 2004). Este gen se ha identificado mediante clonación posicional basada en el cartografiado y ha mostrado ser el responsable de la exudación de citrato inducida por Al, mecanismo primario de tolerancia al aluminio en sorgo (Magalhaes y col. 2007). El hecho de que la segregación de *Alt_{SB}* sea suficiente para explicar el 80% de la variación fenotípica para la inhibición del crecimiento de la raíz producida por Al en cultivo hidropónico sugiere que *Alt_{SB}* también es el principal determinante del comportamiento agronómico superior desarrollado por SC283 sobre suelos ácidos intoxicados con Al. Debe hacerse notar, sin embargo, que la toxicidad por Al es uno de los más importantes pero no la única fuente de estrés abiótico en suelos ácidos. Por tanto, debe considerarse la existencia de otros genes relacionados con la adaptación a los suelos ácidos. A pesar de esto, comparaciones recientes entre el comportamiento agronómico en suelos ácidos y la inhibición del crecimiento de la raíz en cultivos hidropónico indican que ambas características están altamente correlacionadas en sorgo. Los genotipos que llevan el alelo *Alt_{SB}* de SC283 producen aproximadamente 1 mt ha⁻¹ más que las líneas hermanas con alelo *Alt_{SB}* inferior (Magalhaes y col. sin publicar). El gen *Alt_{SB}* codifica para un miembro de la familia MATE de Extrusión de Compuestos Tóxicos y Multidrogas (“Multidrug and Toxic Compound Extrusion”, MATE), el gen se induce por Al alcanzando los máximos niveles de expresión después de varios días de exposición al estrés por AL (Magalhaes y col. 2007). En la población original utilizada para construir el mapa genético, los alelos *Alt_{SB}* segregantes no mostraron polimorfismo en la región que codifica para la proteína, por el contrario, si se observaron diferencias significativas en la región promotora. Un transposón de la clase MITE y las secuencias que lo flanquean inmediatamente crean una unidad repetida de 243 pb; el alelo sensible tiene tres repeticiones de esta unidad mientras que el tolerante (SC283) posee cinco

(Magalhaes y col. 2007). El número de repeticiones está relacionado positivamente con la exudación de citrato, el crecimiento de la raíz y la expresión génica. Un nivel relativamente alto de expresión constitutiva de *Alt_{SB}* en una línea tolerante isogénica no va acompañado por una gran y rápida exudación de citrato. Este resultado sugiere que la regulación de este gen y la actividad de la proteína son más complicadas de lo esperado. Quizás, El Al sea necesario para activar el transporte o la expresión génica no tenga lugar en la epidermis en ausencia de Al. Para responder a estas cuestiones ya se han iniciado experimentos.

La otra familia de proteínas, la familia MATE, es muy amplia, con representantes en todos los reinos y 48 miembros solamente en *Arabidopsis* (Magalhaes y col. 2007). Las proteínas de esta familia se caracterizaron, en primer lugar, por conferir resistencia a microbios por un mecanismo de eflujo o exudación. Por este motivo, se denominaron proteínas de exudación o eflujo de toxinas y múltiples drogas (MATE). Aunque la mayoría de los miembros de esta familia siguen sin caracterizarse, algunos funcionan eliminando compuestos tóxicos y metabolitos secundarios del citosol, exportándolos fuera de la célula o secuestrándolos en la vacuola. Recientemente, se han caracterizado tres genes de la familia MATE, el gen *Frd3* en *Arabidopsis*, el gen *Alt_{SB}* en sorgo y el gen *Alp* en cebada. El mutante *frd3* (llamado inicialmente *nam1*) acumula metal, presenta una alta actividad Fe-reductasa en las raíces, tiene alterada la homeostasis del Fe y en algunas situaciones puede acumular el exceso de Fe en los tallos y hojas nuevas. El gen *Frd3* codifica para una proteína (*FDR3*) cuya función sería introducir citrato en el xilema de manera que el complejo Fe: citrato pueda subir por el xilema y estar disponible para las células de los tallos y hojas nuevas.

2.3.2.2 Resultados Obtenidos En Cebada:-

Un locus que controla la tolerancia al aluminio, *Alp*, se localizó en el cromosoma 4H mediante el uso de trisómicos (Minella y Sorrells 1997). Posteriormente, el locus *Alp* se situó en el brazo largo del cromosoma 4H en una población derivada del cultivar Dayton y estudios posteriores con diferentes poblaciones para construir mapas identificaron genes de tolerancia en el mismo cromosoma (Tang y col. 2000, Raman y col 2002, Ma y col 2004). La exudación de ácido cítrico y la tolerancia al aluminio se han correlacionado positivamente en una amplia muestra de 21 cultivares de cebada, mientras

que la exudación de citrato y el contenido en Al en la raíz estaban negativamente correlacionados, indicando que la exclusión de Al mediada por ácido cítrico era la responsable de la tolerancia al aluminio en cebada (Zhao y col. 2003). Esta conclusión fue confirmada y ampliada por Ma y col. (2004b), que encontró co-localización entre el gen de tolerancia al aluminio del cromosoma 4H y las tasas de exudación de citrato. El ligamiento total o completo de un homólogo de la familia MATE de cebada (*HvMATE* o *HvAACT1*) con el locus *Alp* se describió en una población doble haploide (Wang y col. 2007). La expresión de *HvMATE* se ha correlacionado con la tolerancia al estrés por Al y con el flujo de citrato activado por Al, conduciendo a los investigadores a considerar la hipótesis de que el gen *HvMATE* es el responsable de la tolerancia producida por el locus *Alp*. La construcción de mapas genéticos de alta resolución y análisis de “microarrays” han confirmado que un miembro de la familia MATE, *HvAACT1*, confiere tolerancia en cebada (Furukawa y col. 2007). El gen *HvAACT1* clonado por Furukawa y colaboradores potencia la exudación de citrato activada por Al y la tolerancia al aluminio en líneas transgénicas de tabaco. La proteína se ha localizado en la células epidérmicas de los ápices de la raíces de cebada en la membrana plasmática, basándose en los resultados de fusión con GFP (Green Fluorescent Protein). Además, los resultados de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis* indican que la proteína es más específica de citrato que de malato (Furukawa y col. 2007). Se han analizado cultivares de cebada que difieren en la resistencia al aluminio y se ha encontrado una correlación positiva con el nivel de expresión del RNA mensajero de *HvMATE* en las raíces. Sin embargo, solamente se han detectado cuatro SNPs en los ORF de estos cultivares que no explican las diferencias de expresión. El gen *Alp* ha sido propuesto como el ortólogo al gen de trigo *TaALMT1* localizado en el brazo 4DL. Sin embargo el gen *Alp* (*HvMATE*) se ha secuenciado y ha resultado ser un transportador de citrato activado por aluminio de la familia MATE, habiendo sido designado *HvMATE* (Wang y col. 2007, Furukawa y col. 2007). Por tanto, este resultado indica que el gen *Alp* (*HvMATE*) localizado en 4HL en cebada y el gen *TaALMT1* localizado en 4DL en trigo no deben ser ortólogos, ya que uno es un transportador de citrato y otro de malato, con estructuras en intrones y exones muy diferentes y pertenecientes a distintas familias génicas.

Sorgo y cebada muestran varias similitudes en la herencia de la tolerancia al aluminio, ambas especies presentan un control genético sencillo (un locus)

para la tolerancia al aluminio que reside según algunos autores en genes homólogos (Hoekenga y Magalhaes 2011). Sin embargo, la cebada se considera una de las especies más sensibles entre los cereales, mientras que las variedades de sorgo pueden exhibir niveles extremadamente altos de tolerancia al aluminio (Wang y col. 2006). La comparación entre las secuencias de las proteínas codificadas por *HvMATE* y *Alt_{SB}* pone de manifiesto varias diferencias significativas, ya que presentan solamente un 65% de identidad y un 79% de similitud. También muestran una estructura muy diferente en exones e intrones y además aparentemente tienen un diferente número de regiones o dominios transmembrana. Aunque existen similitudes en los dos genes, como el nivel de expresión constitutiva en ausencia de Al y la activación por Al de las proteínas MATE de sorgo y cebada, las diferencias estructurales pueden ser las responsables de las importantes diferencias en los niveles de tolerancia al aluminio producidos por *HvMATE* y *Alt_{SB}*. Un tercer transportador de la familia MATE, FRD3 de *Arabidopsis*, podría también contribuir a la exclusión de Al a través de la exudación de ácido cítrico (Durrett y col. 2007). La expresión ectópica de FRD3, que normalmente está implicado en el transporte y metabolismo del hierro, es capaz de producir un modesto aumento de la tolerancia al estrés por Al en *Arabidopsis* (Durrett y col. 2007). El análisis comparado de las tres proteínas MATE, *Alt_{SB}*, *HvMATE* y FRD3, pone de manifiesto la existencia de dominios y residuos importantes para el transporte de citrato y la activación por Al.

2.3.2.3 Resultados Obtenidos En Centeno, Trigo, Maíz Y Arroz:-

El centeno es uno de los cereales más tolerantes al aluminio (Aniol y Gustafson 1984) al contrario que la cebada. En parte, podría deberse al efecto aditivo de los ácidos málico y cítrico, que se exudan simultáneamente cuando ciertos genotipos de centeno se exponen al aluminio (Li y col. 2000). Sin embargo, esta no debe ser la única causa, ya que algunos cultivares de trigo también exudan ácido cítrico además de ácido málico (Ryan y col. 2009). Estudios realizados en *Triticale*, que es un híbrido entre trigo y centeno, han identificado genes en el brazo corto del cromosoma 3R necesarios para la exudación de ácidos orgánicos en *Triticale* (Ma y col. 2000). El patrón de exudación en centeno es de tipo II, con una fase de varias horas después de la exposición al aluminio sin exudación de ácidos orgánicos, sugiriendo la existencia de inducción a nivel génico o de proteínas para conseguir la máxima actividad. Es interesante recordar que la exudación de citrato

modulada por el gen de tolerancia *Alt_{SB}* es también inducible a lo largo del tiempo de exposición al aluminio, una respuesta que es paralela a la expresión de *Alt_{SB}* (Magalhaes y col. 2007). Teniendo en cuenta que el cromosoma 3R de centeno es parcialmente equivalente al cromosoma 3 de sorgo, es posible que un gen MATE ortólogo del *Alt_{SB}* de sorgo sea responsable de la exudación de citrato (Magalhaes y col. 2004). Sin embargo, es importante recordar que en el cromosoma 3R de centeno se encuentran genes para málico deshidrogenasa (Salinas y Benito 1984), cuya ausencia podría influir en los niveles de ácido málico en el interior de la célula y que, por el momento, no se ha encontrado ningún gen de la familia MATE en el cromosoma 3R de centeno. Sin embargo, si se ha descrito un gen ortólogo al *HvAACT1* o *HvMATE* de cebada que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7R y que colocaliza con el *QTL_{Alt5}* de tolerancia al aluminio en centeno (Silva-Navas y col. 2011). Este gen de centeno se ha denominado *ScAACT1* o *ScMATE1*, tiene una estructura en intrones y exones muy semejante a la del gen *HvMATE* (13 exones y 12 intrones), una identidad y similitud muy elevadas con el gen de cebada, se expresa fundamentalmente en raíz y su expresión se induce por Al. Además, la expresión de este gen es muy variable de unos cultivares a otros indicando la existencia de alelos que contribuyen a la tolerancia al aluminio y de otros cuya aportación no ha sido posible detectar. Este gen, *ScMATE1*, además está ligado a 25 cM de distancia del locus de tolerancia al aluminio *Alt4* (cuyo candidato es el gen *ScALMT1*) (Silva-Navas y col. 2011). La estructura en intrones y exones de este gen se indica en la (Figura 1.16). Collins y col. (2008) también han encontrado en centeno el gen ortólogo de *HvMATE* de cebada en el mismo brazo cromosómico (7RS) y a 27,5 cM del locus *Alt4*. Sin embargo, en su caso el gen *ScMATE* no contribuía a la tolerancia al aluminio en la población analizada.



Figura 1.16. Estructura del gen *ScMATE1* en centeno. Contiene 13 exones y 12 intrones. En la región “downstream” se han detectado secuencias de MITEs.

Yokosho y col. (2010) han aislado en centeno dos genes de la familia MATE que están implicados en la destoxificación de Al y en el transporte del hierro desde las raíces a los coleóptilos, *ScFRDL1* y *ScFRDL2*. El gen *ScFRDL1* muestra una identidad del 94,2 % con el gen *HvMATE* o *HvAACT1* de cebada,

un transportador de citrato activado por Al en cebada y, el gen *ScFRDL2* presenta una identidad del 80,6% con el gen de arroz *OsFRDL2*, una proteína de respuesta al aluminio. Ambos genes, *ScFRDL1* y *SCFRDL2*, se expresan principalmente en la raíz, sin embargo, muestran diferentes patrones de expresión. La expresión de *ScFRDL1* no se altera por Al pero, sin embargo, aumenta por tratamientos con deficiencia en hierro (Yokosho y col. 2010). Este gen, *ScFRDL1*, es el mismo que el descrito por Silva-Navas y col. (2011) en centeno, el gen *ScMATE1* o *ScaACT1* que en una de las F₂ analizadas co-localiza con el *QTL_{Alt5}* de tolerancia al aluminio. Sin embargo, el gen *ScMATE1* descrito por Silva-Navas y col. (2011) se induce bastante por Al en algunos cultivares y líneas consanguíneas y no lo hace en otros cultivares de centeno. *ScFRDL1* también es el mismo gen que el descrito por Collins y col. (2008) en centeno y que en sus cruzamientos no contribuye a la tolerancia. El gen *ScFRDL2* se induce mucho por estrés con Al pero no por deficiencia en hierro en la línea consanguínea IR5 de centeno analizada por estos investigadores. La inducción tiene lugar en los ápices de las raíces y en la zona basal. Además, la expresión de *ScFRDL2* es consistente con el patrón de exudación de citrato. Mediante inmunotinción se ha observado que la proteína producto de *ScFRDL1* se localiza en todas las células de los ápices de las raíces y en el cilindro central y la endodermis en la zona basal de las raíces. Los resultados obtenidos por Yokosho y col. (2010) sugieren que *ScFRDL1* está implicado en el flujo de citrato en el xilema para el transporte de hierro de las raíces a los coleóptilos, mientras que *ScFRDL2* estaría implicado en la exudación de citrato activada por Al en centeno. Estos resultados, aparentemente contradictorios para la implicación del gen *ScFRDL1* en la tolerancia al aluminio en centeno, en realidad no lo son, simplemente indican la existencia de variabilidad en la contribución de este gen a la tolerancia y en su inducción por Al. Por otro lado, es necesario recordar que un gen cuya expresión no cambia por el tratamiento por Al, como por ejemplo el gen *TaALMT1* de trigo, es, sin embargo, el principal gen de tolerancia al aluminio descrito en trigo.

La exudación de ácido cítrico se produce de forma constitutiva en algunos cultivares de trigo brasileños (Ryan y col. 2009). El flujo de citrato ha mostrado estar controlado por un solo locus en dos cruzamientos diferentes que segregaban para este carácter. En una F₂ entre un cultivar que exuda citrato (Carazinho) y otro que no lo hace (EGA-Burke) se ha identificado un locus principal en el brazo 4BL, el locus *Xce*, que explica más del 50% de la

variación observada para el carácter flujo de citrato. Este locus se ha vuelto a detectar en un segundo cruzamiento entre Carazinho y Egret (que no exuda citrato) y se ha localizado a 6.3 cM del microsatélite *Xgwm495* (Ryan y col. 2009). Estos autores también han detectado un EST de la familia MATE cuya expresión esta correlacionada con el flujo de citrato. Por tanto, estos datos sugieren que en el brazo largo del cromosoma 4B de trigo existe probablemente un gen de la familia MATE responsable de la exudación de citrato detectada en los cultivares brasileños. Por su localización cromosómica en 4BL y teniendo en cuenta las relaciones de sintenia entre trigo, cebada y centeno, el gen de trigo responsable del locus *Xce* de exudación de citrato podría ser probablemente ortólogo de los genes descritos en cebada, *HvMATE* del cromosoma 4H (Wang y col. 2007) y centeno, *ScMATE1* o *ScAACT1* situado en 7RS (Silva-Navas y col. 2011). Este gen de trigo podría, por tanto, denominarse *TaMATE1*. Además, este resultado indica que en trigo no solamente funciona como mecanismo de tolerancia al aluminio la exudación de malato, de manera que la exudación de citrato también contribuye al igual que sucede en centeno.

Maron y col. (2010) han clonado e identificado dos genes de la familia MATE en maíz, *ZmMATE1* y *ZmMATE2*, que co-localizan con dos QTL de tolerancia situados en los cromosomas 6 y 5, respectivamente. Ambos genes codifican para proteínas de la membrana plasmática que intervienen de forma significativa en el flujo de aniones en experimentos de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus*. *ZmMATE1* se expresa fundamentalmente en las raíces, se induce por Al y su expresión es mayor en genotipos tolerantes que en los sensibles. Sin embargo, la expresión de *ZmMATE2* no está localizada específicamente en ningún tejido y no responde al estrés por Al. La expresión de *ZmMATE1* en *Arabidopsis* transgénicas produce un aumento significativo de la tolerancia. Los datos obtenidos por Maron y col. (2010) sugieren que *ZmMATE1* es un gen funcionalmente homólogo a los descritos en sorgo (*Alt_{SB}*), cebada (*HvMATE*) y *Arabidopsis* (*AtMATE*) y, probablemente es el gen responsable del mayor QTL de tolerancia descrito en maíz localizado en el cromosoma 6. Sin embargo, *ZmMATE2* probablemente no codifica para un transportador de citrato y podría estar implicado en un nuevo mecanismo de tolerancia al aluminio.

Las plantas de arroz también exudan ácido cítrico por sus raíces en respuesta al estrés con Al. Los datos de expresión heteróloga en oocitos de anfibios

(*Xenopus*) indican que la proteína OsFRDL4, perteneciente a la familia MATE, codificada por el gen *OsFRDL4* (Os01g0919100) es capaz de transportar citrato cuando se activa con Al (Yokosho y col. 2009). La expresión de la citada proteína es muy baja en las raíces de arroz en ausencia de aluminio pero se induce en gran cantidad poco tiempo después de su exposición al aluminio (Yokosho y col. 2009). Además, la expresión de *OsFRDL4* está regulada por *ART1*, un factor de transcripción de “dedos de zinc” tipo C₂H₂ para la tolerancia al aluminio. Los experimentos de expresión transitoria en cebolla indican que se localiza en la membrana plasmática y en los ápices de las raíces. Los mutantes “knockout” para *OsFRDL4* muestran una disminución significativa de la tolerancia al aluminio y un descenso de la secreción de citrato comparados con las plantas normales, aunque la concentración de citrato en el xilema no parece estar alterada (Yokosho y col. 2009). También se ha detectado una correlación positiva entre el nivel de expresión de *OsFRDL4* y la cantidad exudada de citrato por cultivares que difieren en su nivel de tolerancia.

Los estudios de relaciones filogenéticas llevados a cabo con proteínas de la familia MATE de diferentes especies, indican que la proteína codificada por este gen de arroz (*OsFRDL4*) es ortóloga a la proteína codificada por el gen de sorgo *Alt_{SB}*. En trigo, centeno y cebada aún no se han encontrado los genes ortólogos al gen *Alt_{SB}* y de sorgo ni al gen *OsFRDL4* de arroz, estos dos genes de la familia MATE tiene una estructura en exones e intrones muy diferente al de los genes *HvMATE* de cebada y *ScMATE1* de centeno.

2.3.3 A Través De Oxalato:-

El ácido málico y el cítrico no son los únicos ácidos orgánicos que se unen (son ligandos) al Al descritos en los exudados de las raíces. El ácido oxálico (oxalato) también se ha descrito en los exudados de las raíces de plantas tratadas con Al y es un agente quelante efectivo, intermedio entre el citrato y el malato en términos de disociación constante por unión al aluminio. La exudación de oxalato activada por Al se ha descrito en alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyron esculentum*), maíz, taro (*Colocasia esculentum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) (Ma y Miyasaka 1998, Zheng y col. 1998, Kidd y col. 2001, Tesfaye y col. 2001). No se ha identificado hasta la fecha ningún transportador de oxalato activado por Al semejante a los encontrados para malato y citrato. Podría ser que los transportadores de las familias MATE y ALMT fueran

también permeables a oxalato. Sin embargo, los transportadores de oxalato representan una tercera categoría de transportadores de ácidos orgánicos que está por ser descubierta y descrita.

2.3.4 Metabolismo De Los Ácidos Orgánicos:-

La actividad de las enzimas y la expresión de los genes implicados en la cadena de transporte de electrones y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) cambia cuando las plantas se someten a estrés. La toxicidad por metales pesados, el estrés hídrico y el estrés oxidativo desencadenan numerosas alteraciones metabólicas conducentes a mantener la producción energética, regular el ambiente redox celular y la supervivencia del organismo (Fedotcheva y col 2006; Mailloux y col 2007; Lemire y col 2008; Atkin y Macherel 2009). Existen ejemplos de alteración de la actividad enzimática de las enzimas que intervienen en el transporte de electrones en la mitocondria por estrés con Al en diferentes especies de microorganismos, plantas y animales (Efraín Ramírez Benítez y col 2008; Kumari y col 2008; Mailloux y col 2008).

Ya hemos comentado que en el proceso de exudación de ácidos orgánicos pueden distinguirse tres etapas: la percepción del aluminio, el metabolismo de los ácidos orgánicos (síntesis y/o degradación de los ligandos del aluminio) y la exudación de los ácidos orgánicos. Algunos autores opinan que es mucho menos factible alterar la tolerancia modificando el metabolismo de los ácidos orgánicos (Hokenga y col. 2011). Ya hemos indicado que la sobre-expresión de citrato sintasa en *Nicotiana* ha dado lugar a resultados contradictorios (de la Fuente y col. 1997, Delhaize y col. 2001). En la (Tabla 1.3) se encuentra un resumen de los resultados obtenidos en distintas especies cuando se sobre-expresan genes de citrato sintasa (CS) y malato deshidrogenasa (MDH). Aunque en alfalfa y colza se han obtenido resultados positivos con malato deshidrogenasa y citrato sintasa, respectivamente (Tesfaye y col. 2001, Anoop y col. 2003), en maíz no se han detectado cambios en la exudación de citrato que puedan relacionarse con diferentes niveles de tolerancia (Pineiros y col. 2005). La sobre-expresión del gen de trigo, *TaALMT1*, en cebada podría interpretarse suponiendo que los niveles internos de ácidos orgánicos no serían una limitación para la tolerancia (Delhaize y col. 2004). En la (Tabla 1.3) se resumen los resultados obtenidos cuando se introducen genes que codifican para enzimas del metabolismo de los ácidos orgánicos, como citrato sintasa y malato deshidrogenasa, de unas especies en otras.

Tabla 1.3. Genes de citrato sintasa y malato deshidrogenasa introducidos en otras especies.

Gen	Especie donadora	Especie receptora	Resistencia estrés Al	Referencia
Citrato sintasa	<i>P. aeruginosa</i>	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Aumenta	De la Fuente y col. 1997
Citrato sintasa	<i>A. thaliana</i>	Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	Aumenta	Koyama y col. 1999
Citrato sintasa	<i>P. aeruginosa</i>	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	No cambia	Delhaize y col. 2001
Citrato sintasa	<i>A. thaliana</i>	Canola (<i>Brassica napus</i>)	Aumenta	Anoop y col. 2003
Citrato sintasa	<i>P. aeruginosa</i>	Alfalfa (<i>M. Sativa</i>)	Aumenta	Barone y col. 2008
Malato deshidrogenasa	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa (<i>M. Sativa</i>)	Aumenta	Tesfaye y col. 2001

Por el momento, la influencia del metabolismo de los ácidos orgánicos y su acumulación en las raíces en la tolerancia al aluminio no se conocen de forma suficiente. En las especies vegetales con patrón de exudación de tipo I (aquellas en las que la exudación comienza inmediatamente después del tratamiento con Al) no se ha observado correlación entre los niveles internos de ácidos orgánicos y su exudación. Por ejemplo, los genotipos de trigo tolerantes y sensibles al aluminio no difieren en sus concentraciones de malato, aunque las variedades resistentes exudan 10 veces más malato que las sensibles (Delhaize y col. 1993). De forma semejante, los genotipos tolerantes y sensibles de maíz no difieren en la concentración de citrato en sus tejidos y el Al aumenta por igual la acumulación de citrato en las raíces en ambos tipos de variedades, sin embargo solamente se observa una exudación de citrato significativa en los genotipos tolerantes (Pellet y col. 1995). Por el contrario, en soja donde la exudación de citrato comienza varias horas después del inicio del tratamiento con Al, existiendo una fase de retraso (patrón de exudación de tipo II), la acumulación interna de citrato inducida por Al contribuye al aumento en la exudación de dicho ácido orgánico (Silva y col. 2001).

En la (Figura 1.17) se indican algunas de las enzimas clave involucradas en el metabolismo del citrato que podrían estar involucradas en la tolerancia al aluminio en diferentes especies vegetales. Los trabajos en los que se ha estudiado el posible papel de las enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos inducidos por Al han originado resultados diversos. En trigo, la exudación de malato tiene lugar sin cambios significativos de las actividades enzimáticas de PEPC (Fosfoenol piruvato carboxilasa) y de malato deshidrogenasa (NAD-MDH). Además, las actividades de estas dos enzimas no

difieren significativamente entre los genotipos tolerantes y sensibles (Ryan y col. 1995).

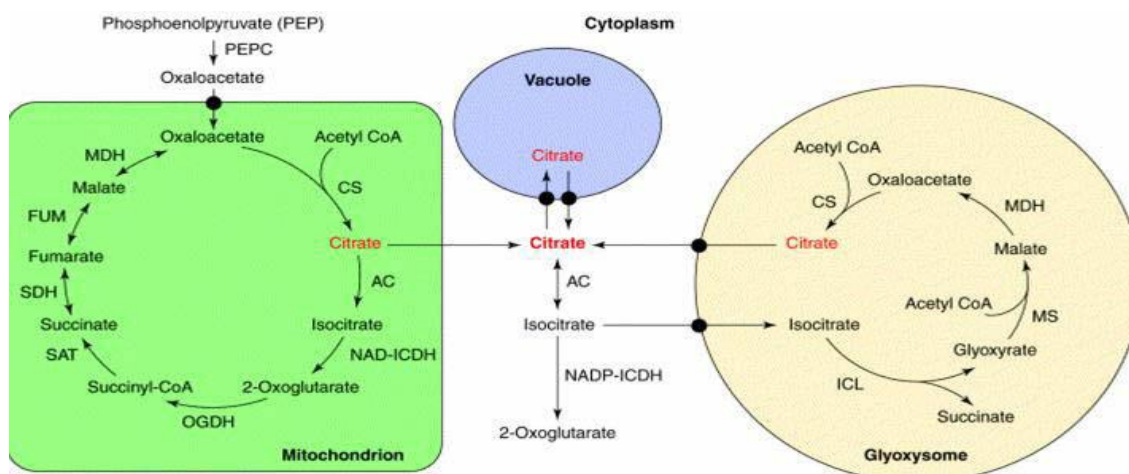


Figura 1.17. Enzimas claves involucradas en el metabolismo de citrato (Ma y col., 2001).

PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; **CS**: citrato sintasa, **NAD-ICDH**: NAD-isocitrato deshidrogenasa, **AC**: aconitasa; **OGDH**: α-cetoglutarato deshidrogenasa; **SAT**: succinil-CoA sintetasa, **SDH**: succinato deshidrogenasa, **FUM**: fumarasa; **MDH**: malato deshidrogenasa.

En cambio, en *Phaseolus vulgaris* (Mugai y col. 2000) y en *Cassia tora* (Yang y col. 2004) se ha detectado un aumento de la actividad citrato sintasa inducido por el tratamiento con Al. De forma similar, el tratamiento con Al aumenta la expresión génica y la actividad enzimática de la citrato sintasa mitocondrial en soja (Eticha y col. 2010). Además, la sobre-expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos ha demostrado ser efectiva aumentando la exudación de dichos aniones orgánicos y la tolerancia al aluminio en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Koyama y col. 2000), alfalfa (Tesfaye y col. 2001) y canola (Anoop y col. 2003).

Rangel y col. (2010) han estudiado los cambios en las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo del citrato. El tratamiento con Al reduce la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) disminuyendo el consumo de citrato interno y aumentando su exudación. El contenido en citrato de las raíces depende de la síntesis de citrato, de la exudación, de la degradación y de su consumo para otras funciones metabólicas. Por tanto, la exudación continua de citrato, manteniendo la concentración normal de citrato en las raíces, requiere un aumento en la síntesis y/o reducción de su degradación. La reducción de la actividad de la NADP-isocitrato deshidrogenasa produce acumulación y exudación de citrato en células de zanahoria mutantes que son capaces de crecer en fuentes de fósforo insolubles

(Kihara y col. 2003). Pero, de acuerdo con Rangel y col. (2010), para mantener la exudación de citrato en judías no solamente es necesaria una reducción de la actividad de NADP-isocitrato deshidrogenasa, también es importante mantener las actividades de la citrato sintasa y de Fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC). El fallo en la exudación continua de citrato en los genotipos de *Phaseolus vulgaris* sensibles al aluminio ha sido atribuido principalmente a la menor actividad constitutiva de citrato sintasa (CS) que posteriormente se inhibe por tratamientos más prolongados con Al. Sin embargo, Ehtica y col. (2010) no han detectado cambios significativos en la expresión de los genes que codifican para algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos. Igualmente, Kumari y col. (2008) no han detectado cambios significativos en la cantidad de los mensajeros de 52 genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), excepto para MDH, en un análisis transcriptómico a gran escala mediante “microarrays” en *Arabidopsis*.

Sin embargo, está claro que deben producirse cambios en la regulación de los niveles internos de ácidos orgánicos ya que las plantas tolerantes de trigo exudan 10 veces más ácido málico que las sensibles. Tal vez, con estudios más cuidadosos y sistemáticos de las interacciones entre la percepción de Al, la síntesis de ligandos y su exudación puedan encontrarse patrones que nos indiquen de forma más clara como manipular y mejorar estos procesos para mejorar la tolerancia al estrés por Al. Además, es necesario recordar que una gran cantidad de estudios se han llevado a cabo analizando la actividad enzimática y no la expresión de los genes que codifican para las enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos orgánicos. La mayoría de los estudios basados en actividades enzimáticas no distinguen por separado la actividad procedente de las distintas formas moleculares (isoenzimas) citoplásmicas, mitocondriales o localizadas en otros compartimentos subcelulares. Por consiguiente, los cambios detectados en la actividad enzimática no necesariamente van acompañados por variaciones en la abundancia de mensajeros de genes concretos.

3. La Composición De La Pared Celular:-

Además de los transportadores de ácidos orgánicos (genes de la familia *ALMT* y *MATE*) y de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos. Existen muchos otros tipos de genes que pueden estar involucrados en la tolerancia al estrés por Al. La primera barrera que se encuentra cualquier

nutriente, mineral o agente externo para acceder a las células de las raíces es la pared celular. Por tanto, la estructura y composición de las paredes celulares puede jugar un papel importante en muchas de las situaciones de estrés ante las que se enfrenta una planta.

La pared celular vegetal posee una estructura complicada que participa en la determinación del tamaño de las células y de su forma, en el crecimiento y desarrollo, en la comunicación intercelular y en la interacción con el medio ambiente. La pared celular primaria se compone principalmente de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectinas), enzimas y proteínas estructurales (Figura 1.18).

Las pectinas son los principales componentes de la lámina media y primaria de las paredes celulares vegetales en dicotiledóneas (suponen del 30-35% de la pared en peso seco), mientras que en las especies de la familia Poaceae se encuentran en menor cantidad (5-10%) (Smith and Harris y col 1999). La pectina es un polisacárido presente en la pared celular de todas las plantas superiores, contribuyendo a su integridad y rigidez. Como tal, desempeña un papel importante durante la maduración, almacenamiento y procesamiento de materias primas vegetales para su posterior consumo alimenticio. Se extrae de distintas fuentes vegetales y se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, debido a sus propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes. Recientemente, la pectina ha ganado interés como ingrediente de alimentos funcionales debido a los posibles efectos beneficiosos para salud.

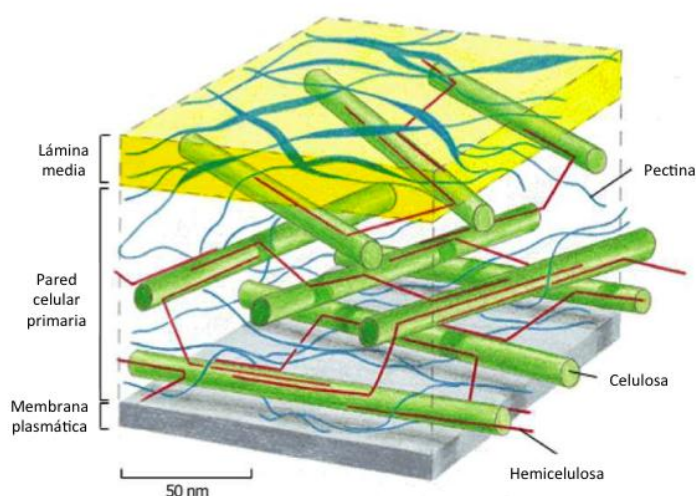


Figura 1.18. Representación esquemática de la pared celular de las plantas superiores (adaptado de McCann y Roberts, 1996).

Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Las pectinas contienen cuatro tipos de dominios: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos de tipo I (RGI) y tipo II (RGII) y Xylogalacturonanos (XGA) (Willats y col. 2001) que difieren en la estructura de los enlaces de la macromolécula y en la presencia y diversidad de cadenas laterales (Pelloux y col. 2007). Las pectinas se sintetizan en el aparato de Golgi y posteriormente se transportan a la pared celular (Grsic-Rausch y Rausch, 2004). Las pectinas de la pared celular aparecen en formas metil-esterificadas. Dichas pectinas pueden modificarse por la acción de las pectinasas, como las pectin metilesterasas (PME), que catalizan la desmetil-esterificación de los homogalacturonanos liberando pectinas ácidas y metanol (Figura 1.19).

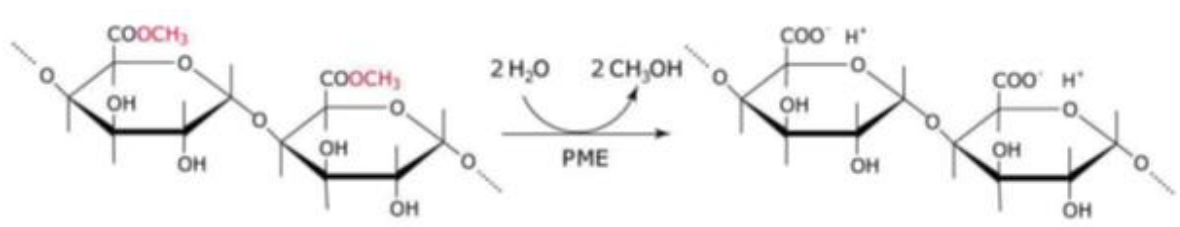


Figura 1.19. Reacción de desmetil-esterificación de la pectina catalizada por la PME (adaptado de Micheli, 2001).

3.1 Pectin Metilesterasa (PME):-

La PME (EC 3.1.1.11) es una enzima con alta especificidad de sustrato. Actúa sobre las sustancias pécticas que forman parte del material de la pared celular. La enzima desmetila los grupos carboximetil -COOCH₃ de las cadenas pécticas, produciendo ácido poligalacturónico y descendiendo el pH (Balestrieri y col., 1990) ya que aumenta el número de grupos carboxilo -COOH libres en sus posiciones originales. Esto da lugar a una disminución de la solubilidad de la pectina, siendo este efecto más pronunciado en presencia de sales divalentes (Van Buren, 1973). En los últimos años, se ha obtenido una gran cantidad de información sobre las funciones de la PME en plantas que incluyen una gran cantidad de datos genómicos. Dichos datos muestran que las enzimas de PME que pertenecen a una gran familia de múltiples genes y que sus estructuras primaria y cuaternaria están muy conservadas entre los diferentes taxones de plantas.

En *Arabidopsis thaliana*, se han detectado 67 ORFs que codificarían para secuencias putativas de PME. Por tanto, representan un 6,81% del total de enzimas activas del metabolismo de hidratos de carbono (CAZymes) y expansinas en esta especie (Coutinho y col., 2003). Las cifras

correspondientes para *Populus trichocarpa* son 89 ORFs y un 5,46%, respectivamente (Lee, et al. 2006), mientras que en arroz (*Oryza sativa*) se han detectado menos ORFs (35) con secuencias putativas de PME y representan un 3,14% de las CAZymes y expansinas (<http://www.Tigr.org/tdb/e2k1/osal>). El menor número de genes de PME en arroz es consistente con el hecho de que las pectinas son menos abundantes en monocotiledóneas que en dicotiledóneas.

Las PME se han clasificado en dos grupos. Las PME del grupo 1 no tienen ninguna extensión en la región N-terminal (región PRO) mientras que las PME del grupo 2 tienen región PRO. Las PME de bacterias y hongos tienen un dominio PME (Pfam01095, IPR00070) característico con regiones de aminoácidos conservadas, un dominio péptido señal (SP) y un dominio transmembrana (TM) en la región N-terminal. Las PME de bacterias y hongos no poseen región PRO y pertenecen, por tanto, a las PME del grupo 1. Sin embargo, las PME de plantas superiores se caracterizan por la presencia del dominio PRO de longitud variable y pertenecen a las PME del grupo 2. Esta región PRO muestra similitudes con el dominio inhibidor PME (dominio PMEI, Pfam04043, IPR006501). Las PME del grupo 2 tienen el dominio PME (Pfam01095) en la zona C-terminal, el dominio PMEI (Pfam04043), los dominios SP y/o TM en la región N-terminal y también un motivo de procesamiento (PM, normalmente con la siguiente secuencia de aminoácidos RRLI o RKLI) situado en el centro y que podría ser un diana putativa para proteínas del tipo subtilisina (Figura 1.20) (Micheli, 2001; Tian y col., 2006).

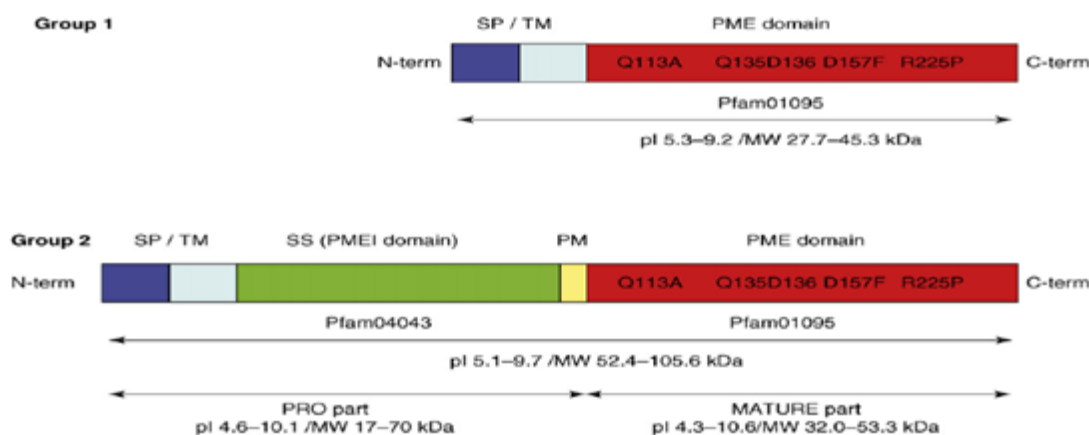


Figura 1.20. Motivos estructurales de la pectin metilesterasa (PME). Las PME de los grupos 1 y 2 poseen un dominio PME (Pfam01095) altamente conservado en todas PME descritas hasta la fecha. El dominio PMEI (Pfam04043) sólo está presente en las PME del grupo 2.

Las PME están implicadas en la génesis de microsporas, el crecimiento del polen, la germinación de semillas, el desarrollo de las raíces, el crecimiento de las hojas, la elongación del tallo, la maduración del fruto y la pérdida de la integridad de los tejidos (Tieman y Handa, 1994; Wen y col., 1999; Micheli y col., 2000; Pilling y col., 2000, 2004; Micheli, 2001; Bosch y col., 2005; Jiang y col., 2005; Bosch y Hepler, 2006; Francis y col., 2006; Tian y col., 2006). Las PME están involucradas, directa e indirectamente, en diversos procesos fisiológicos asociados con el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas. Intervienen en la extensión y rigidez de la pared celular (Moustakas y col., 1991; Al-Qsous y col., 2004), en la separación celular (Sobry y col., 2005; Wen y col., 1999), en la germinación de las semillas (Ren y Kermode, 2000), en la elongación de la punta de la raíz (Pilling y col., 2004), en el crecimiento de la hoja (Hasunuma y col., 2004), en el crecimiento de los entrenudos del tallo (Saher y col., 2005), en la dehiscencia de los frutos secos y en la maduración de la fruta (Ferraándiz, 2002; Brummell y col., 2004; Eriksson y col., 2004; Arancibia y Molsenbocker, 2006).

3.2 Relación entre PME y las respuestas frente al estrés biótico y abiótico en las plantas:-

Debido a que la pared celular constituye una barrera física entre el medio y el contenido interno de las células vegetales, las modificaciones de la pared celular se asocian a menudo con las respuestas de defensa vegetal (Vorwerk, y col., 2004). La actividad de la enzima PME produce, directa o indirectamente, tres tipos de sustancias involucradas en la defensa de la planta.

En primer lugar, se ha observado la producción de metanol en las interacciones planta-herbívoro (Penñuelas, y col., 2005; Von Dahl, y col., 2006). En segundo lugar, la actividad PME origina un aumento de las cargas negativas en la pared celular (Moustakas y col., 1991), cambia el PH apoplástico y, potencialmente, la actividad de las proteínas apoplásticas. Las cargas negativas generadas por la actividad de la PME permiten la unión de cationes y esta situación puede favorecer o inhibir el crecimiento de las plantas en función de las circunstancias (Pilling y col., 2004). Por ejemplo, el contenido de aluminio puede ser modulado por la actividad PME (Schmohl, et al., 2000). De hecho, en este estudio se ha demostrado que la sobre-expresión de la actividad PME conduce a un aumento en el contenido de

aluminio en la planta, lo que podría estar relacionado con la reducción en el grado de metil-esterificación de la pectina.

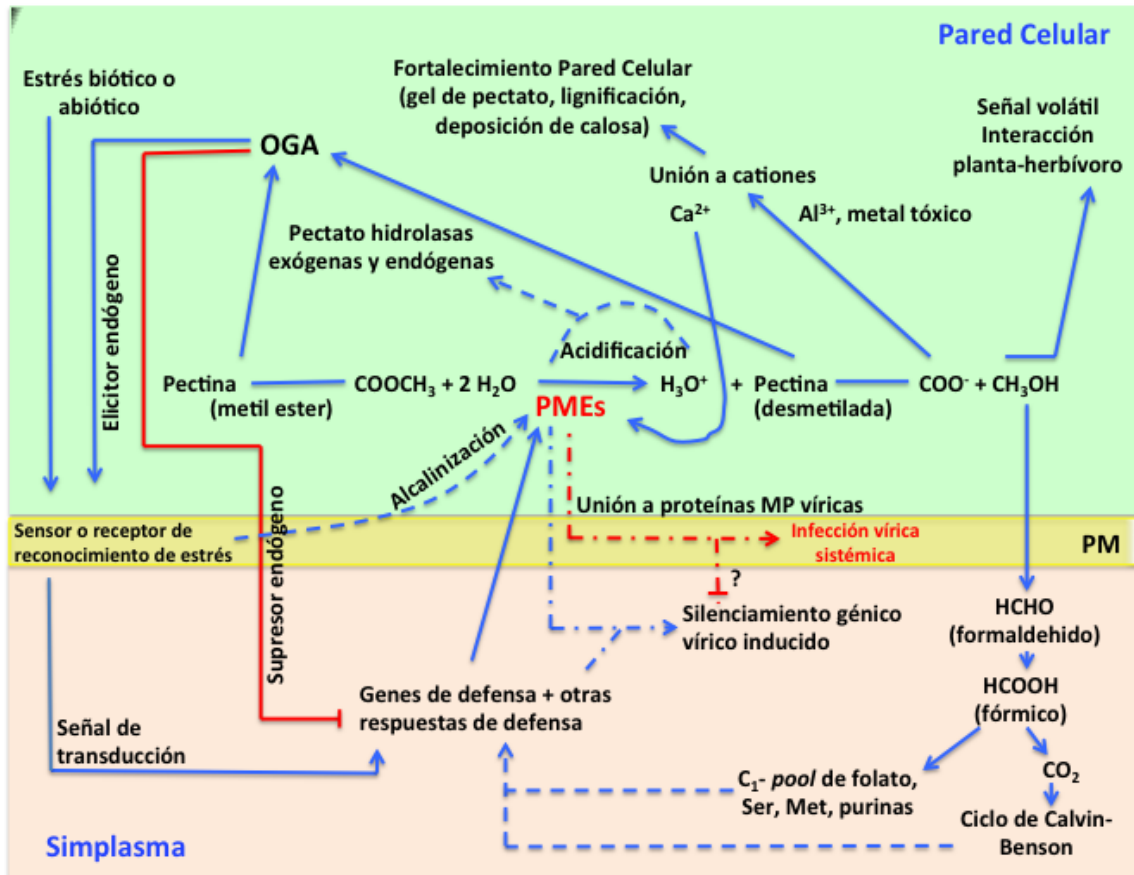


Figura1.21. Modelo de implicación de las PME en la defensa de las plantas. Después del reconocimiento de diferentes tipos de estrés biótico y abiótico a través de diferentes mecanismos de transducción de señal se inducen varios sistemas de defensa. Tales respuestas implican la inducción de genes de defensa, incluyendo algunas proteínas PME (de respuesta específica al estrés) que se transportan a la pared celular donde desmetilesterifican los homogalacturonos (HGA, aquí pectinas). Los productos de esta reacción están directa o indirectamente relacionados con respuestas de defensa. El HGA desmetilesterificado, en el que las cargas negativas están expuestas, está implicado en la unión a cationes, que deben, directa o indirectamente, reforzar la pared celular y promover la fijación de iones metálicos tóxicos. El calcio libre que debe ser liberado por la fijación de Al estimula la actividad de las PME. Las PME son sensibles al pH y pueden estar moduladas por alcalinización del medio, una de las primeras respuestas de defensa en algunas interacciones planta-patógeno, o mediante la acidificación resultante del aumento en los niveles de H_3O^+ , un producto secundario de la actividad de las PME. Otras enzimas de la pared celular que actúan sobre las pectinas y producen oligogalacturonidos (OGAs) están moduladas por la acidificación del medio, incluyendo las pectato hidrolasas procedentes de las plantas (endógenas) o de los patógenos (exógenas). Dependiendo del grado de polimerización y/o metilesterificación los OGAs pueden actuar como elicitores (inductores de cambios o respuestas fisiológicas) internos que estimulan las defensas de la planta, incluyendo la inducción de los genes de PME, o como supresores endógenos de las respuestas de defensa. El metanol, el tercer producto de la actividad de las PME, debe ser una señal volátil en las interacciones planta-hervívoro, o metabolizarse (convertirse) en formato, y por consiguiente estar implicado en la biosíntesis o catabolismo de aminoácidos, purinas, azúcares y ácidos orgánicos que podrían emplearse en el metabolismo de defensa de la planta. Las PME podrían tener un papel doble en las interacciones planta-virus, estando implicadas en el silenciamiento génico inducido en virus y/o en las infecciones sistémicas de virus por unión a proteínas de movimiento (MP) de virus. Las consecuencias adversas o perjudiciales de las proteínas PME o de los productos derivados de la actividad de las PME en plantas se han indicado en color azul. Abreviaturas; MP: Proteínas de Movimiento, PM: Membrana Plasmática. Esquema procedente de TRENDS in Plant Science.

En tercer lugar, muchos de los compuestos derivados de la pectina participan en la defensa de las plantas (Vorwerk y col. 2004; Moscatiello y col. 2006). En la Figura 1.21 se puede encontrar un modelo resumido de la implicación de las PME en los mecanismos de defensa de plantas. La mayoría del AI asociado con la raíz (>80%) se puede encontrar en la pared celular, de acuerdo con las

estimas realizadas en maíz y trigo (Ma y col. 2004a, Wang y col. 2004). Esta asociación es probablemente la responsable de la reducción de la capacidad de extensión de la pared celular observada en las plantas tratadas con Al (Jones y col. 2006, Zakir Hossain y col. 2006). La pregunta es si existen diferencias significativas en la pared celular entre los cultivares tolerantes y sensibles: construyen sus paredes celulares los cultivares tolerantes de forma diferente a los cultivares sensibles o las diferencias observadas se deben meramente a la exclusión de Al. La composición de la pared celular cambia como consecuencia de la exposición al aluminio, especialmente en las pectinas (Eticha y col. 2005, Zakir Hossain y col. 2006, Yang y col. 2008). Este resultado es significativo ya que la des-esterificación de las pectinas aumenta la densidad de las cargas negativas en la pared celular. Un aumento de la carga neta negativa podría permitir una mayor carga de Al en la pared celular (Cosgrove 2005).

El aumento de la fracción esterificada de pectinas se ha correlacionado con el aumento en las tasas de elongación celular en *Arabidopsis* (Derbyshire y col. 2007). Las variedades tolerantes de maíz y trigo muestran altos grados de metil-esterificación de las pectinas que producen una menor entrada de Al en la pared celular (Eticha y col. 2005, Yang y col. 2008). Desafortunadamente, ambos estudios se han realizado comparando un sola variedad tolerante con otra sensible. La significación estadística de estos estudios es muy baja, pero los resultados son interesantes ya que son coincidentes en ambas especies. Además, el Al^{3+} es un potente inhibidor de las expansinas, una familia de enzimas móviles de la pared celular responsables del crecimiento en repuesta ácida (Cosgrove 2000). El movimiento y expansión de la pared celular disminuye o se elimina en ausencia de la actividad de las expansinas. Si el Al^{3+} inactiva las expansinas, esto podría explicar la rápida pérdida del crecimiento de las raíces observado en las raíces tratadas con Al. Si existieran isoformas de expansinas tolerantes al aluminio podrían existir loci de tolerancia muy poderosos ya que protegerían la elongación celular en presencia de estrés por Al.

3.3 Los Genes ALS Que Codifican Proteínas Transportadoras De Tipo ABC:-

Las proteínas transportadoras ABC constituyen una gran familia, en *Arabidopsis* hay unos 130 genes que codifican para estas proteínas (Schulz y Kolukisaoglu 2006). Algunas de estas proteínas de la familia ABC detoxifican

sustancias orgánicas e inorgánicas secuestrándolas en las vacuolas. En *Arabidopsis* se han descrito dos mutantes sensibles a Al^{3+} (als1 y als3) que poseen mutaciones en los genes que codifican proteínas transportadoras de la familia ABC (Larsen y col. 2005, Larsen y col. 2007). La función de las proteínas ALS1 y ALS3 es aún desconocida aunque se piensa que pueden conferir tolerancia movilizando y secuestrando Al^{3+} en la planta.

3.4 Exudación De Aniones Orgánicos Por Deficiencia De Fósforo (P):-

Algunas especies exudan aniones orgánicos por las raíces como respuesta a la falta de fósforo (P) permitiendo a la planta explotar formas poco solubles de P. Por ejemplo, el citrato aumenta la disponibilidad de P en el suelo reponiendo el fosfato inorgánico a partir de complejos insolubles o desplazándolo a partir de ligandos de la superficie de los minerales del suelo (Ryan y col. 2001). Estudios electrofisiológicos realizados en altramuza (*Lupinus albus*) y *Arabidopsis* indican que el eflujo de citrato se lleva a cabo probablemente por canales aniónicos (Roberts 2006). No se sabe si hay proteínas de las familias ALMT y/o MATE implicadas en el eflujo de aniones orgánicos producido por la deficiencia de P.

3.5 Mensajeros Que Se Inducen Por Estrés Con Aluminio:-

Se han descrito genes que responden al estrés por Al comparando los mensajeros que se expresan en plantas tolerantes y sensibles, en ausencia y presencia de Al, en especies como trigo (Snowden y Gardner 1993, Richards y col. 1994, Richards y Gardner 1994, Cruz-Ortega y col. 1997, Hamel y col. 1998), arroz (Yu y col. 1998), tabaco (Ezaki y col. 1995, 1996), *Arabidopsis* (Richards y col. 1998) y guisante (Brosché y Strid 1999, Sävénstrand y col. 2000). También se han generado ESTs en centeno a partir de raíces tratadas con Al y sin tratar para estudiar los cambios en la expresión bajo estrés por Al (Rodríguez-Milla y col. 2002). Además, se han detectado los genes *IMPDH* y *PEPC* que se expresan exclusivamente en soja tolerante (Ermolayev y col. 2003), los genes *TaPSS1* (Delhaize y col. 1999) y *VATPaseB* (Hamilton y col. 2001) en trigo o el gen *WAK1* en *Arabidopsis* (Sivaguru y col. 2003).

4- El Centeno

4.1 Taxonomía:-

El centeno (*Secale cereale* L.) pertenece a la Familia Poacea (*Gramineae*), Sub-Familia Pooideae, Tribu Triticeae, Sub-Tribu Triticinae y Género Secale (GRIN 2010, <http://www.ars-grin.gov>). Por tal motivo, el centeno se encuentra incluido en la División Magnoliophyta y en la Clase Liliopsida formando parte, por tanto, de las Angiospermas y Monocotiledoneas (Figura 1.22).

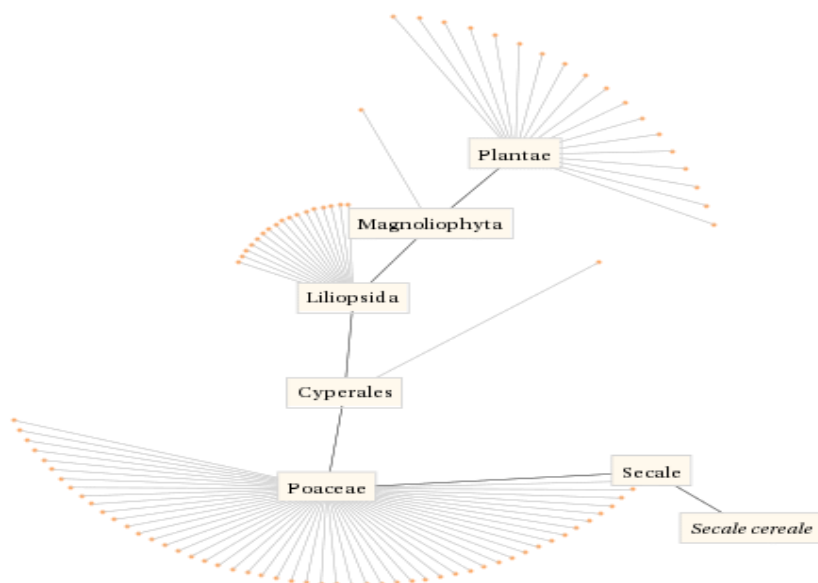


Figura 1.22. Esquema en el que se indica que el centeno (*Secale cereale*) pertenece al género *Secale* que a su vez se encuadra en la familia Poacea (*Gramineae*) que a su vez pertenece a la clase *Liliopsida* y división *Magnoliophyta*.

La Familia Poaceae de las gramíneas se subdivide en más de 40 tribus formando una de las familias más grandes con 610 géneros y 10.000 especies. Los miembros de esta familia son muy abundantes en todas las regiones climáticas del planeta. El arroz, el trigo, el mijo y el centeno forman parte de la dieta diaria de millones de personas. Otros cereales como el maíz y la cebada se emplean de forma intensiva en la producción animal. Las semillas de los cereales son la materia prima para una gran cantidad de productos de fermentación y destilación alcohólica como la cerveza y el whisky, respectivamente. El mijo es un recurso muy valioso para obtener aceite, la caña de azúcar tiene una gran importancia en el comercio internacional y, otros miembros de la Familia Poaceae como el bambú se utilizan ampliamente como material de construcción.

Triticeae, es el nombre científico de la Tribu de las gramíneas que incluye al centeno, trigo (*Triticum aestivum*, *Triticum durum* y especies diploides del

género *Triticum*), la cebada (*Hordeum vulgare*), el triticale (*xTriticosecale* Witmack) y cerca de otras 350 especies, incluyendo especies afines de los géneros *Aegilops*, *Agropyron*, *Haynaldia* y *Elymus* (Barkworth y Bothner 2009). La taxonomía y la nomenclatura en la Tribu Triticeae han sufrido en los últimos años grandes modificaciones de manera que no se ha llegado a un consenso general relativo al número de géneros que incluye.

Diferentes análisis filogenéticos han confirmado la monofilia en la Tribu Triticeae y del Género *Secale* (Petersen y col. 2004). El Género *Secale*, a pesar de ser pequeño, tiene un peso relevante en la Tribu Triticeae (Akhavan y col. 2009).

El Género *Secale* incluye especies perennes y anuales, con autofecundación (autocompatibles), con polinización cruzada (autoimcompatibles) y especies salvajes y cultivadas (Vences y col. 1987). La mayoría de los taxones son alógamos, es decir, autoimcompatibles y se reproducen mediante polinización cruzada (Chikmawati y col. 2005). Por tal motivo, las mayoría de los taxones de centeno están constituidos por individuos con genotipos muy variables y es difícil conseguir y mantener cultivares genéticamente puros constituidos por individuos homocigóticos idénticos (Bushuk 2001).

La taxonomía del Género *Secale* aún sigue sin estar clara, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados, existiendo una gran controversia a lo largo de los años. Dependiendo del criterio utilizado se han reconocido desde tres a 14 especies dentro del Género *Secale* GRIN 2010, <http://www.ars-grin.gov>.

Los primeros estudios sobre la sistemática del Género *Secale* se efectuaron por Vavilov (1917, 1926) basándose en las características morfológicas, ciclo de vida y en la distribución geográfica. Vavilov identificó cuatro especies: *S.africanum* Stapf., *S.cereale* L., *S.fragile* Marsch. y *S.montanum* Guss.

Poco tiempo después, Zhukovsky (1928) propuso tres subespecies para la especie *S.cereale* L. la subespecie *cereale* Zhuk. para el centeno cultivado y las subespecies *segetale* y *acentrale* Zuk. para los centenos silvestres. En 1933, la subespecie *S.ancestrale* fue considerada, por el mismo autor, una nueva especie (Zhukovsky 1933).

Roshevitz (1947) basándose en la viabilidad de los cruzamientos entre las especies propuso 14 especies y las clasificó en tres series principales: *Cerealía*, *Kuprijanovia* y *Silvestria*. La primera serie incluía el centeno cultivado (*S.*

cereale L.) y todas las formas silvestres anuales relacionadas (*S. afganicum* Vav., *S. ancestrale*, *S. dighoricum* Vav., *S. segetale* y *S. vavilovii* Grossh.). Todos los miembros de esta serie tenían tres cromosomas con translocaciones. La segunda serie (Kuprijanovia) englobaba todas las especies perennes (*S. africanum*, *S. anatolicum* Boiss., *S. ciliatoglume* Bpoiss., *S. dalmaticum* Vis., *S. daralagesi* Thum., *S. kuprijanovii* Grossh y *S. montanum*). La última serie contenía solamente una especie anual *S. sylvestre* Host. (sinónimo de *S. fragile* Marsch.).

Khush y Stebbins (1961) mediante estudios citogenéticos demostraron que los cromosomas de *S. cereale* diferían de los de *S. sylvestre* por tres translocaciones recíprocas, estando dos de estas translocaciones presentes también entre *S. montanum* y *S. cereale*. Sin embargo, *S. montanum* y *S. sylvestre* diferían solamente en una pequeña translocación (Figura 1.23). Por tanto, desde el punto de vista citogenético, los miembros de la serie Cerealia Rosh. estaban más próximos a los miembros de la serie Kuprijanovia Rosh., existiendo una relación próxima entre estos últimos y *S. sylvestre*.

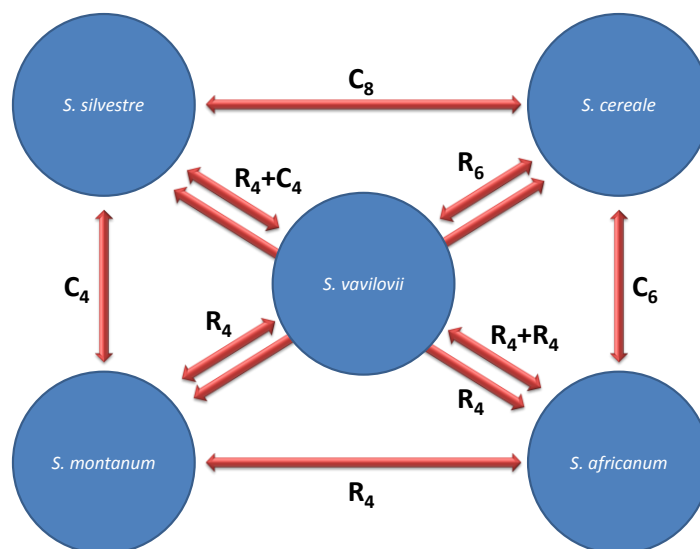


Figura 1.23. Resumen de las translocaciones que diferencian a las distintas especies del género *Secale*. Se indican las configuraciones meióticas observadas en los híbridos entre las especies indicadas. C4: cadena de cuatro cromosomas (cuadrivalente), C6: cadena de seis cromosomas (hexavalente), C8: cadena de ocho cromosomas (octovalente), R4: anillo de cuatro cromosomas (cuadrivalente), R6: anillo de seis cromosomas (hexavalente). Khush y Stebbins (1961).

Basándose en estos resultados, Khush (1962) propuso que los centenos perennes, *S. africanum*, *S. kuprijanovii* y *S. montanum* fuesen considerados de la misma especie, por el hecho de no haber encontrado un apoyo citogenético para diferenciarlas, pero que fuesen consideradas como subespecies de

S.montanum. Además, también propuso que las especies silvestres anuales relacionadas con *S.cereale* (*S.afganicum*, *S.ancestrale*, *S.dighoricum* y *S.segetale*) fuesen consideradas como subespecies de *S.cereale*, tal como constató Zhukovsky (1928). Según Khush (1962) estas formas cruzan fácilmente con el centeno cultivado, los híbridos son vigorosos tienen meiosis normales y la fertilidad del polen es tan elevada como la de los parentales.

Un año más tarde, Khush (1963) reconoció cinco especies divididas en dos secciones basándose en la viabilidad de los cruzamientos, la morfología y apareamiento de los cromosomas. En la primera sección incluyó al centeno anual *S.sylvestre* y, en la segunda sección, a las restantes especies que eran fértiles entre ellas, *S.africanum*, *S.cereale*, *S.montanum* y *S.vavilovii*.

Mediante aproximaciones químico taxonómicas, Dedio y col. (1969) indicaron que *S.sylvestre* estaría más próximo a la serie Cerealia Rosh., contrariando a Roshevitz (1947) y a Khush y Stebbins (1961) que indicaron que los miembros de la serie Cerealia Rosh. eran más similares a los de la serie Kuprijanovia Rosh. que al *S.sylvestre* de la serie Silvestria.

Posteriormente, Zohary (1971) dividió el Género *Secale* en dos grupos, Montanum y Cerealia, separando los centenos perennes de los anuales con formas salvajes y cultivadas. Zohary juntó la especie *S.sylvestre* con la serie Cerealia Rosh. apoyando la propuesta de Dedio y col. (1969).

Stutz (1972) apoyándose en estudios citológicos, ecológicos y morfológicos consideró la existencia de 4 a 12 especies, dependiendo del criterio utilizado para definir las especies, y las clasificó en dos grupos principales, anuales y perennes. Stutz (1972) agrupó otra vez, los miembros de la serie Cerealia Rosh. con la especie *S.sylvestre*.

Sencer (1975) reconoció tres especies biológicas dentro del género *Secale*: *S.cereale*, *S.montanum* y *S.sylvestre*. La primera especie, incluía los centenos anuales cultivados y silvestres, la segunda, abarcaba todos los centenos perennes silvestres con elevada semejanza morfológica y afinidad citogenética y, la tercera, comprendía una especie anual silvestre, *S.sylvestre*, que se encuentra geográficamente, ecológicamente y reproductivamente aislada de *S.montanum*.

Vences y col. (1987) no encontraron una diferencia clara entre *S.cereale* y *S.montanum* empleando isoenzimas. Además, Vences y colaboradores

encontraron que *S.sylvestre* se diferenciaba de *S.vavilovii* y ambos se distinguían de las dos especies alógamas. Más tarde, Hammer (1990) apoyándose en los datos de Vences y col. (1987) dividió el Género en cuatro especies: las especies anuales y autógamas *S.sylvestre* y *S. vavilovii*, la especie alógama anual *S.cereale* y la especie perenne *S.strictum* Presl. (sinónimo de *S.montanum* Guss.).

Reddy y col. (1990) analizaron la variación en longitud de los espaciadores de ADN ribosómico (ADNr) y demostraron que el centeno anual *S.sylvestre* estaba aislado en lo referente a sus relaciones con los otros taxones, es decir, que mostró ser realmente distinto. El centeno cultivado mostró ser similar a los centenos silvestres anuales y perennes, demostrando que es difícil separar a *S.cereale* de *S.strictum*. Por Tanto, la separación de *S.sylvestre* es consistente con la clasificación propuesta para el género *Secale* por Khush (1963).

Frederiksen y Petersen (1998) consideraron tres especies (*S.cereale*, *S.strictum* y *S.sylvestre*) en una revisión taxonómica del género *Secale* y cinco subespecies (*S.cereale* subps. *cereale* y subps. *ancestrale* y *S.strictum* subps. *strictum* y subps. *africanum*).

Más recientemente, Chikmawati y col. (2005) mediante AFLPs (polimorfismos para longitudes de fragmentos amplificados) obtuvieron resultados que apoyan el agrupamiento realizado por Stutz (1972) y que son consistentes con las consideraciones efectuadas por Frederiksen y Petersen (1998) (ver Figura 1.24).

De acuerdo con el sistema de taxonomía adoptado por la “American Germplasm Resources Information Network” (GRIN 2010, <http://www.ars-grin.gov>), se reconocen actualmente en el género *Secale* cuatro especies: la especie alógama anual *S.cereale* L., los centenos anuales autógamos *S.sylvestre* Host. (sinónima de *S.fragile* Marsch.) y *S.vavilovii* Grossh. (sinónima de *S.iranicum* Kobyl.) y la especie perenne alógama *S.strictum* Presl. (sinónima de *S.montanum* Guss.). Existen ocho subespecies de *S.cereale*: subps. *afghanicum* (Vavilov) K.Hammer, subps. *ancestrale* Zhuk., subps. *cereale* (el único centeno cultivado), subps. *dighoricum* Vavilov, sbps. *rigidum* Vavilov & Antropov (sinónima de *S.turkestanikum* Bensin), subps. *segetale* Zhuk., subps. *tetraploidium* Kobyl y subps. *tsitsinii* Kobyl. La especie *S. strictum* tiene cinco subespecies: subps. *africanum* (Stapf.) K. Hammer (que al contrario de los miembros de este grupo es autógama), subps. *anatolicum*

(Boiss) K. Hammer, subsp. *ciliatoglume* (Boiss.) K. Hammer, subsp. *kuprijanovii* (Grosh.) K. Hammer y subsp. *strictum* (sinónima de *S. montanum* Guss.).

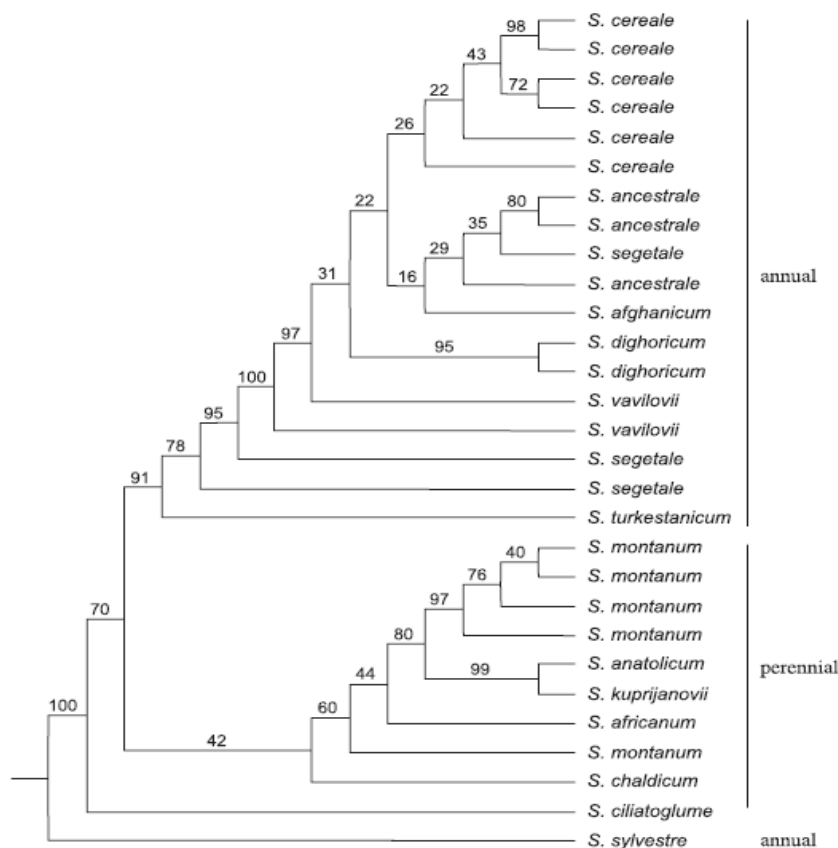


Figura 1.24. Dendrograma obtenido con datos de AFLPs en diferentes especies del género *Secale*. Para obtenerlo se ha empleado la distancia genética de Nei-Li y el método UPGMA de agrupamiento. Los números indicados en las ramificaciones son los valores de "bootstrap". Publicado por Chikmawati y col. 2005.

Las diferentes clasificaciones que se han realizado dentro del género *Secale* a lo largo de los últimos años son el resultado de la diversidad de técnicas y métodos utilizados en los análisis filogenéticos. Al principio se emplearon marcadores morfológicos, ecológicos y citogenéticos (por ejemplo Vavilov 1926, Roshevitz 1947 y Stutz 1972). Posteriormente, Dedio y col. (1969) utilizaron cromatografía. En los últimos años las relaciones filogenéticas dentro de la misma especie y entre especies diferentes se han analizado mediante marcadores bioquímicos, como las isoenzimas (Matos y col. 2001) y marcadores genéticos como los ISSR (Inter-microsatélites) (Matos y col. 2001), RAPDs (Del Pozo y col. 1995, Matos y col. 2001, Persson y col. 2001, Ma y col. 2004), los RFLPs (Petersen y Doebley 1993, Loarce y col. 1996), los

microsatélites (SSRs) (Shang y col. 2006, Akhavan y col. 2009) y los AFLPs (Chikmawati y col. 2005). Además, también se han estudiado los espaciadores de ADNr (Reddy y col. 1990), las secuencias ITS (espaciadores internos transcritos) (De Bustos y Jouve, 2002) y la presencia y distribución de diferentes secuencias de ADN repetido (Cuadrado y Jouve, 2002).

4.2 Origen Del Centeno Cultivado:-

Las variedades de centeno cultivadas se originaron a partir de formas *salvajes* que fueron transportadas junto con trigo y cebada, como contaminantes, hacia las regiones de altitudes elevadas del Norte. Las condiciones más rigurosas de estas regiones nortenas, más favorables al centeno que al trigo y la cebada, permitieron que el centeno *salvaje* fuera favorecido y que se constituyera como cultivo principal e independiente (Pinto-Carnide 1990). Los centenos contaminantes del Sudoeste Asiático y de Asia Central serían, según esta hipótesis, los progenitores del centeno cultivado.

El origen exacto del cultivo de centeno es desconocido. Sin embargo, se sabe qué hace 6.000 años el centeno era cultivado en varias localidades de Turquía, del noroeste de Irán y en Armenia (Evans 1995, citado por Hancock y col 2004). Por el hecho de no haberse encontrado vestigios de *S. cereale* en materiales arqueológicos antiguos, se considera que su origen es relativamente reciente, de la Edad del Bronce (Cuadrado y Jouve 2002).

El centeno se introdujo en Europa, probablemente, entre 2.000 y 2.500 años antes de Cristo por dos vías; a través del Norte del Cáucaso y a través de Asia Central (Khush 1962).

Las especies del género *Secale* que se han sugerido como antecesor inmediato de *S. cereale* han sido muchas y en diferentes momentos. Como hemos visto los estudios taxonómicos utilizando diferentes tipos de abordajes, marcadores y técnicas han originado distintas hipótesis sobre la filogenia del género *Secale*. Vavilov (1926) y Roshevitz (1947) consideraron que *S.vavilovii* evolucionó a partir de *S.montanum* que era el antecesor de *S.cereale*. Zukhovskiy (1933) sugirió que *S.cereale* derivó de *S. ancestrale* y que este y *S.montanum* divergieron del ancestro común. Dedio y col. (1969) apuntaron que *S.sylvestre* era el antecesor del centeno cultivado. Khush y Stebbins (1961) y Zohary (1971) concluyeron que *S.cereale* derivó directamente de *S.montanum*. Según Khush (1962) *S.sylvestre* se diferenció de *S.montanum*

mucho más de lo que lo hicieron las otras especies y *S.cereale* subps. segetale sería el antecesor inmediato de los centenos cultivados. Stutz presentó evidencias de que *S.cereale* no podía haber derivado directamente de *S.montanum* sugiriendo que se había originado por introgresión de *S.montanum* en *S. vavilovii*. Este a su vez habría derivado de *S.sylvestre* que habría evolucionado a partir de *S.montanum* o de un ancestral común.

Más recientemente, Vences y col. (1987) volvieron a proponer a *S.montanum* como antecesor directo de las otras especies. Sin embargo, la mayoría de los estudios con marcadores moleculares indican que *S.sylvestre* es la especie más antigua (Reddy y col. 1990, Del Pozo y col. 1995, Shang y col. 2006). Bustos y Jouve (2002) sugieren que *S.sylvestre* surgió probablemente a partir de especies antiguas como *S.montanum*, apareciendo después *S.africanum* que evolucionó en un hábitat diferente y que, por otro lado, *S.vavilovii* y *S.cereale* se diferenciaron de *S.montanum* produciendo formas que actualmente evolucionan de forma independiente.

En general, *S.montanum* es la especie que ha obtenido un mayor consenso por los distintos investigadores como antecesor de *S.cereale* y de las restantes especies.

4.3 Morfología Y Citología:-

El centeno muestra un elevado nivel de variabilidad morfológica que ha sido la causante de las diferentes clasificaciones taxonómicas realizadas a lo largo de los años (Akhavan y col. 2009). Como ya hemos indicado, el género *Secale* incluye centenos perennes, como *S.montanum* (con sus subespecies) y, centenos anuales como *S.cereale* (con sus subespecies), *S. vavilovii* y *S. sylvestre*.



Figura 1.25. Centeno (*Secale cereale* L.).¹

Las plantas jóvenes de centeno son semejantes a las de trigo, exceptuando sus aurículas que son más pequeñas, estrechas y sin vellosidades (Langer y Hill 1991). La vaina y el limbo de la parte inferior de las hojas tienen un poco de vellosidad y, a veces, se observa una fina capa de cera, especialmente con el paso de los años (Chikmawati y col. 2006). Las plantas tienen múltiples hijuelos o tallos largos, erguidos y rígidos, al final de cada tallo suele aparecer una sola espiga (Langer y Hill 1991). En la (Figura 1.25) se puede ver un dibujo de las espigas, semillas y tallos de las plantas de centeno.

Cada espiguilla está constituida por un par de glumas puntiagudas y bastante estrechas y, generalmente, por tres flores. Dos flores son hermafroditas y la tercera es estéril y no se desarrolla (Langer y Hill 1991, Chikmawati y col. 2006). Las flores fértiles tienen un lema en forma de quilla que finaliza en una arista fuerte y una pequeña pálea en forma de barco (Langer y Hill 1991). La especie *S.sylvestre* se distingue morfológicamente de las otras especies por tener aristas mucho mayores y granos de polen esféricos, mientras que las otras especies los tienen ovoides (Frederiksen y Petersen 1997).

Debido a que la mayoría de los centenos son alógamos, las anteras son bastante largas (5-14 mm) (Chikmawati y col. 2006). El rendimiento estimado a través del número de semillas que producen las plantas depende entre otros factores de que tenga lugar una polinización efectiva a través del viento

¹ Parte izquierda de: (a).- Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé. Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz. 1885. Alemania.

(Zohary y Hopf 2000). El estigma de centeno permanece receptivo después de haber sido funcional durante un lapso de tiempo, teniendo lugar después la polinización cruzada, característica que los distingue de las especies autóгамas (Langer y Hill 1991).

Cuando el cariósido se hincha fuerza al lema y la pálea a separarse y entonces se hace visible desde el exterior. Cuando el cariósido (grano) está maduro, se parece al grano de trigo, excepto por ser más delgado, alargado y por tener una cresta dorsal distinta (Langer y Hill 1991).

La mayoría de los centenos se siembran en otoño y generalmente se les denomina “centenos de invierno”. Debido a sus adaptaciones a condiciones de invierno frío y riguroso el centeno puede crecer con éxito en áreas en las que el clima es demasiado severo para la cebada y el trigo. Ma y col. (2004) consiguieron distinguir los “centenos de invierno” de los “centenos de primavera” mediante marcadores moleculares.

Todos los taxones del género *Secale* son diploides con 14 cromosomas ($2n=2x=14$) (Pinto-Carnide 1990, Bushuk 2001, Cuadrado y Jouve 2002) y se pueden cruzar entre sí para producir híbridos parcialmente fértiles (Cuadrado y Jouve 2002). A su genoma se le designa por la letra R, procedente de la letra inicial de centeno en inglés (“rye”) (Wang y col. 1996). Sin embargo, se conocen algunos cultivares tetraploides de centeno cultivado (*S.cereale* L.) (Chikmawati y col. 2006) que han sido producidos artificialmente ($2n=4x=28$) (Pinto-Carnide 1990, Bushuk 2001).

La morfología de los siete cromosomas está muy conservada a lo largo del género (con la excepción del complejo *S.strictum*): tres cromosomas metacéntricos (2R, 3R y 7R), tres cromosomas submetacéntricos (4R, 5R y 6R) y un par cromosómico con satélite, el 1R (Cuadrado y Jouve 2002). El género *Secale*, excepto la especie *S.sylvestre*, se caracteriza por tener cromosomas con grandes bloques heterocromáticos teloméricos y un elevado número de bandas finas intersticiales (Chikmawati y col. 2006). La especie *S.sylvestre* además se distingue de las demás por tener una cantidad muy inferior de secuencias de ADN repetidas al igual que la especie anual autógamma *S.vavilovii* (Cuadrado y Jouve 1997). Además, en el género *Secale* se han descrito mediante análisis citogenéticos tres translocaciones diferentes que implican a distintos brazos cromosómicos y que distinguen los cariotipos de algunos taxones (Khush y Stebbins 1961, Khush 1962). Estas reordenaciones

cromosómicas estructurales se cree que han jugado un papel importante en la evolución y especiación del género (Stutz 1972).

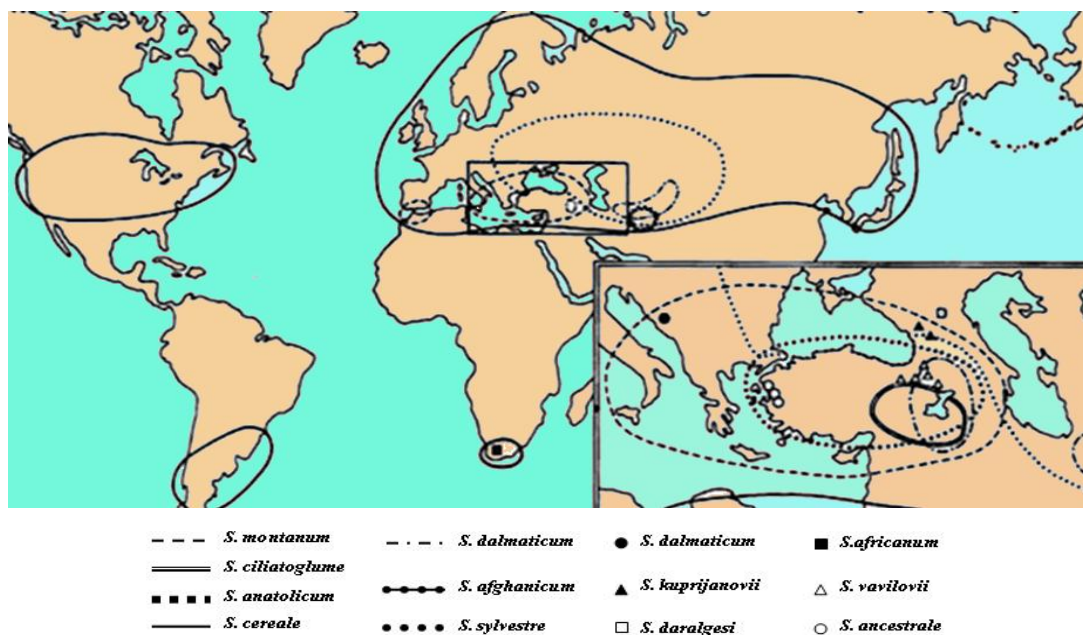


Figura 1.26. Distribución mundial del género *Secale*. Como puede verse tiene una amplia distribución desde Europa Central al Mediterráneo Occidental. También se encuentra en América del Norte y en América del Sur. En África del Sur hay una población aislada. (Sencer y Hawkes 1980).

4.4 Distribución Geográfica Del Centeno:-

El género *Secale* es un representante típico de la flora Mediterránea. Posee una amplia distribución desde Europa Central al Mediterráneo Occidental a través de los Balcanes, Anatolia, Israel y Cáucaso hasta Asia Central, con una población aislada en África del Sur (Sencer y Hawkes 1980) (Figura 1.26).

El centeno cultivado (*S.cereale*) y los centenos anuales relacionados se encuentran generalmente en los espacios abiertos y en campos de cereales del Sudoeste y Centro Asiáticos (De Bustos y Jouve 2002). *S.vavilovii* crece como contaminante en suelos arenosos junto al río Aras, en las laderas más bajas de las montañas y en los campos cultivados de Armenia y Turquía Oriental (De Bustos y Jouve 2002, Chikmawati y col. 2006).

La distribución de *S.sylvestre* abarca un área que incluye Europa del Este, el Cáucaso y Asia Central en suelos arenosos, dunas y cerca del mar (Chikmawati et al. 2006). A su vez, *S.montanum* y las especies perennes relacionadas se encuentran bien adaptadas a zonas secas, rocosas y pedregosas (de ahí procede el nombre de “centeno de montaña”) (Oram 1996). Se trata de un grupo complejo que incluye especies aisladas geográficamente y

distintas, como el caso de las subsp. *africanum* que es endémica del Sudoeste Asiático (Cuadrado y Jouve 2002). En general, este grupo se encuentra ampliamente distribuido en la Europa Mediterránea y en Asia Oriental (De Bustos y Jouve 2002).

4.5 Importancia Económica:-

El centeno, *S.cereale* L., es un cultivo importante, especialmente en zonas del Norte de Europa y de Oriente con suelos pobres e inviernos rigurosos. El centeno posee características fisiológicas muy ventajosas: la eficiencia de nutrientes, la tolerancia al estrés hídrico, soportando la sequía y siendo capaz de crecer en suelos arenosos de baja fertilidad y tolerancia a suelos ácidos (Zohary y Hopf 2000, Bolibok y col. 2005, Chikmawati y col. 2005, Akhavan y col. 2009). El centeno posee un buen rendimiento en áreas en las que ningún otro cultivo crece, es decir, en áreas que no son adecuadas para el cultivo de otros cereales (Bushuk 2001).

El centeno tiene otras características como, un elevado contenido proteico y resistencia a enfermedades (infecciones de virus y bacterias). Aunque con menos frecuencia que al trigo, al centeno también le atacan los céfidos (*Cephus pygmaeus* y *Trachelus tabidus*). Pocas veces lo hace el *Mayetiola destructor*. En cambio, sí puede ser afectado por los nematodos. La roya del tallo (*P.graminis secalis*) y la roya de la hoja (*P.recóndita*) atacan al centeno. La roya amarilla (*P.Striiformis*) es moderadamente patogénica para el centeno. El cornezuelo (*Claviceps purpurea*) es producido por un ascomiceto que ataca al centeno, pero no es específico de él, pues puede encontrarse en gramíneas pratenses y, aunque en raras ocasiones, en el trigo, cebada y arroz. En las espigas se desarrollan una especie de cuernecillos de 1 a 6 cm de largo y 2 ó 3 mm de grueso, que son el esclerocio del hongo que sirve para perpetuarlo. Este cornezuelo sustituye uno o varios granos de centeno. El problema del cornezuelo es que contiene alcaloides que son tóxicos para el hombre. Estos alcaloides son utilizados en farmacia. La enfermedad producida por los alcaloides del cornezuelo del centeno es conocida como ergotismo. Los medios de lucha que se utilizan contra el cornezuelo son: alzar el rastrojo con labor profunda y cribar el centeno.

Además, el centeno posee características bioquímicas y morfológicas que le confieren un valor añadido para su introducción en los programas de mejora de trigo (*Triticum* spp. L.) a través de la obtención de triticales (*xTriticosecale*

Wittmack) y en la mejora de otros cultivos relacionados (Ma y col. 2004, Chikmawati y col. 2005). Su facilidad de cruzamiento y las características fisiológicas ventajosas han convertido al centeno (*S.cereale*) en un recurso muy valioso para detectar nuevos genes útiles en los programas de mejora que empleen el germoplasma de centeno de forma eficiente (Akhavan y col. 2009).

El centeno es además, un cultivo muy versátil. Su harina se emplea en la fabricación de pan para producir “pan negro de centeno” (debido a que su miga es más oscura) o se mezcla con harina de trigo para obtener un “pan mixto trigo-centeno” (Bushuk 2001). El “pan negro de centeno” forma parte de la dieta básica de millones de personas en la Europa del Este y Central (Langer y Hill 1991). El sabor característico del pan de centeno es muy apreciado por muchos consumidores. En la elaboración de productos especiales como el “pan liso” y los “bizcochos de centeno” se utilizan pequeñas cantidades de centeno (Bushuk 2001). La producción de centeno, en cualquier caso es inferior a la de trigo a pesar de tener una harina de menor calidad (Matos 2006).

Las semillas de centeno se emplean mucho en la alimentación del ganado. Además, también se utilizan en la producción de bebidas alcohólicas. El Whisky Canadiense y el Bourbon se obtienen empleando cantidades importantes de centeno (Langer y Hill 1991, Bushuk 2001).

Como planta verde puede emplearse para forraje y como abono verde en la rotación de cultivos. La paja de centeno es fibrosa y muy resistente, por este motivo no se emplea mucho en la alimentación de los animales pero si para sus camas (Bushuk 2001). También pueden emplearse en pequeñas cantidades en la fabricación de papel (Langer y Hill 1991, Bushuk 2001).

El centeno se produce para consumirse como pan, principalmente, en Europa del Este. Actualmente, los principales productores son Rusia, Polonia, Alemania, Bielorrusia, Ucrania, China, España, Turquía y Canadá (FAO 2009) (Figura 2). La producción mundial de centeno ha sufrido un descenso acentuado en los últimos 20 años (32.511.687 Mt en 1987, 25.333.011 Mt en 1997, 14.741.248 Mt en 2007) (Figura 1.27, datos de la FAO 2009). En el año 2007, según la FAO, se produjo un ligero aumento de la producción con respecto al año anterior (12.611.193 Mt en 2006).

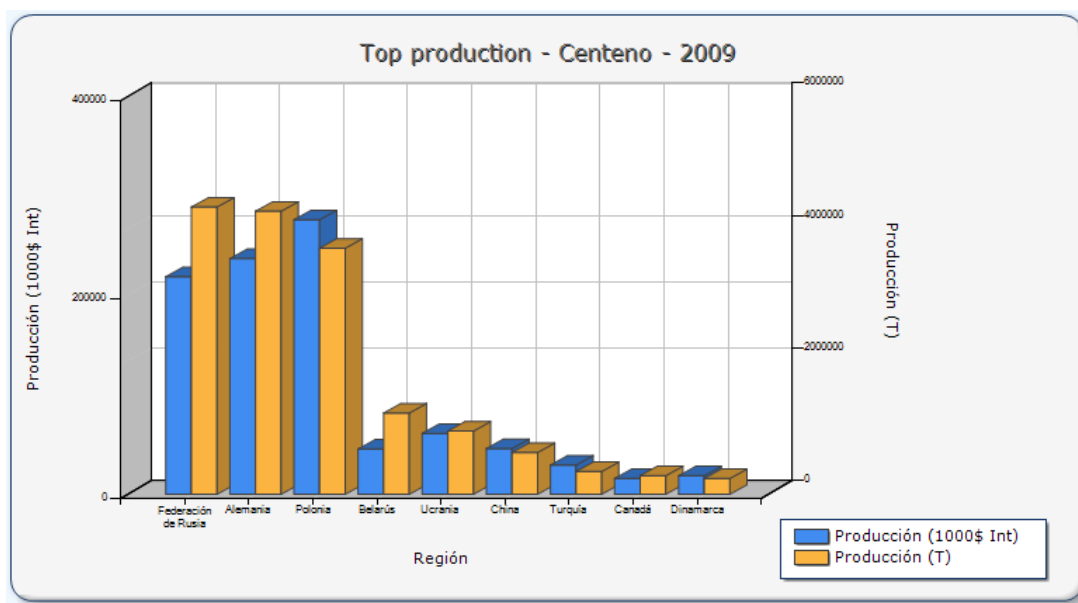


Figura1.27.Datos de la FAO de la producción mundial centeno por países en 2009. Los principales productores en 2009 eran Rusia, Polonia, Alemania, Bielorrusia, Ucrania, China, España, Turquía y Canadá.

La superficie cultivada con centeno y la producción de este cereal se han ido reduciendo en los últimos años de una forma notable en España (Tabla 1.4, anuario estadístico, Mapa 1997). En el año 2009, según la FAO, la producción de centeno en España fue de 180.800 Mt.

AÑO	Superficie Miles de ha	Producción Miles de tm
1975	227.5	240.5
1980	217.0	283.9
1985	211.3	272.8
1990	202.2	267.3
1991	186.7	236.9
1992	179.5	222.3
1993	174.9	333.2
1994	153.9	206.7
1995	165.2	173.1
1996	167.1	295.7
1997	152.2	225.0

Tabla1.4. Anuario estadístico (mapa de 1997). Reducción de la superficie de cultivo y de la producción de centeno en España desde 1975 hasta 1997.

Los datos más recientes sobre el cultivo de centeno (*Secale cereale*) en diferentes zonas de España indican que la zona de mayor producción es la zona centro (Castilla-León junto con Castilla-La Mancha, 186.1 tm), la zona Noroeste (Galicia, Asturias y Cantabria, 195 tm), la zona Noreste (Cataluña y región Valenciana, 65 tm), comunidad de Madrid (29 tm) y Andalucía (7 tm). El cultivo de centeno además tiene una importancia bastante grande en el norte de Portugal (Tras-os-Montes) comparado con las otras regiones de Portugal.

4.6 Centeno Y Salud:-

El centeno es una excelente materia prima para la elaboración de alimentos saludables y nutritivos con un gran contenido en fibras (Zielinski y col. 2007). Las fibras solubles, que ayudan a reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares permitiendo una disminución en los niveles de colesterol LDL en sangre, representan un 17% de las fibras que se encuentran en los alimentos elaborados con semillas de centeno, por ejemplo panes integrales (Rakowska 1996). Además, la ingestión de alimentos integrales también está asociada a una disminución del riesgo de padecer otras enfermedades crónicas como la diabetes y la obesidad, e incluso reducen el riesgo de padecer cáncer (Bondia-Pons y col. 2009).

Además de las fibras alimentarias también contribuyen de forma beneficiosa para la salud la presencia de varias vitaminas y minerales (Bondia-Pons y col. 2009). Las semillas de centeno tienen bastantes vitaminas y minerales importantes, como la vitamina B, la vitamina E, calcio, magnesio, fósforo, potasio, hierro, zinc, y folato (Rakowska 1996). Por esta causa, los productos elaborados con semillas de centeno tienen un gran potencial beneficioso para la salud humana (Bondia-Pons y col. 2009). El ingesta de centeno y de alimentos integrales ha aumentado su popularidad entre los consumidores debido a que existe una relación directa entre la dieta y el bienestar, debido a que los nutricionistas recomiendan un aumento en el consumo de los productos integrales y de las fibras alimentarias y a que los consumidores se preocupan cada vez más por su salud (Zielinski y col. 2007).

4.7. Relación Entre El Genoma De Centeno Y Los Genomas De Otras Especies De Poáceas:-

Mediante estudios citogenéticos (apareamiento cromosómico y técnicas de bandeo cromosómico) y gracias al análisis de una gran cantidad de

marcadores moleculares que han permitido construir mapas genéticos detallados y compararlos en distintas especies de cereales, se ha sugerido que los cereales actuales derivan de un genoma ancestral básico. Estos trabajos han desvelado la existencia de amplias regiones cromosómicas, con información para los mismos genes y en el mismo orden, que se han mantenido a lo largo de la evolución en los cereales. Es decir, han puesto de manifiesto la existencia de un elevado grado de sintenia entre las diferentes especies de cereales. Igualmente, la comparación de las secuencias de nucleótidos para genes equivalentes entre las distintas especies de Poáceas ha revelado la existencia de un elevado grado de homología. Por tanto, gracias a este tipo de estudios, si conocemos la secuencia de un gen en una especie, podemos aislar sin demasiadas dificultades la secuencia del gen equivalente en otra especie de esta familia. Igualmente, si sabemos en qué cromosoma y en qué región del mismo se encuentra un determinado gen, podemos predecir con un grado de fiabilidad bastante alto, el cromosoma y la región en la que se encontrará en otra especie de la familia de las Poáceas.

Como ya hemos mencionado anteriormente, en la evolución del género *Secale* las translocaciones han jugado un papel importante. Las translocaciones también han tenido un papel en la evolución de las Triticineas. Por esta causa, el genoma de centeno se diferencia del genoma de trigo por varios reordenamientos (Naranjo y col. 1987, Devos y col. 1993). (Figura 1.28).

Como se puede observar en la Figura 1.28, el cromosoma 1R de centeno es el más conservado, siendo equivalente a los cromosomas del grupo de homeología 1 de trigo. La mayor parte de cromosoma 2R equivale al grupo de homeología 2 de trigo, excepto el extremo del brazo corto del cromosoma 2R que es parcialmente homeólogo a los brazos cortos de los cromosomas de los grupos 6 y 7 de trigo. El cromosoma 3R en su mayoría es homeólogo de los cromosomas del grupo 3 de trigo, exceptuando el segmento distal del brazo largo del cromosoma 3R que es homeólogo de parte de los brazos largos de los cromosomas del grupo de homeología 6 de trigo. El cromosoma 4R está menos conservado que los anteriores con respecto a trigo, el brazo corto, 4RS, es equivalente a los brazos cortos del grupo de homeología 4 de trigo. Sin embargo, el brazo largo (4RL) en su mayoría equivale a los brazos cortos de los cromosomas del grupo 7 de trigo y el extremo distal es homeólogo de parte de los brazos cortos de los cromosomas del grupo 6 de trigo.

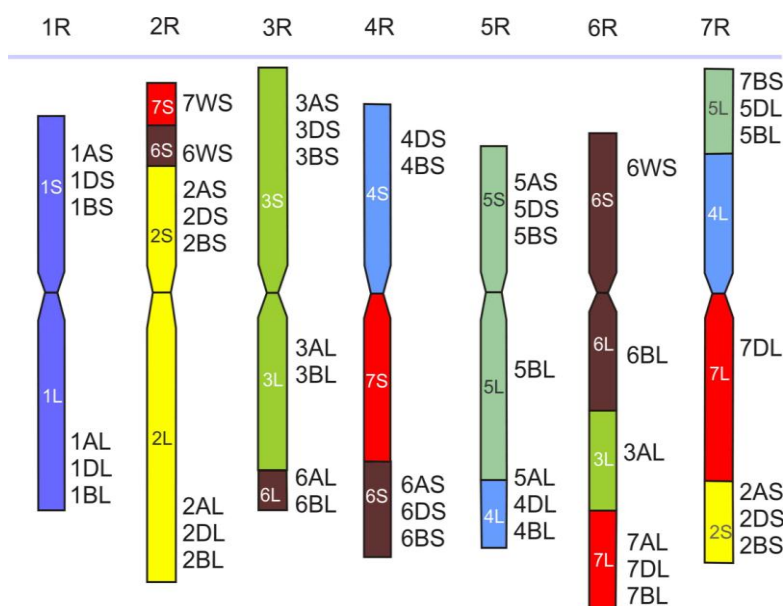


Figura 1.28. Relaciones de sintenia entre los cromosomas de trigo hexaploide (*Triticum aestivum*) y de centeno (*Secale cereale*). Se han representado los cromosomas de centeno (1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R) y en su interior las regiones equivalentes de trigo. Procedente de los trabajos de Naranjo y col. (1987) y de Devos y col. (1993).

El cromosoma 5R en su mayoría equivale a los cromosomas del grupo de homeología 5 de trigo, excepto el extremo distal del brazo largo que es homeólogo de parte de los brazos largos de los cromosomas del grupo 4 de trigo. Los cromosomas 6R y 7R están menos conservados. El brazo corto y parte del largo del cromosoma 6R son equivalentes a los cromosomas del grupo de homeología 6 de trigo. Una buena parte del brazo largo del cromosoma 6R equivale a los brazos largos de los cromosomas de los grupos de homeología 3 y 7 de trigo. Por último, la primera mitad del brazo 7RS es homeóloga de los brazos largos de los cromosomas del grupo de homeología 4 de trigo. El extremo distal del brazo 7RS es equivalente a los brazos largos de los cromosomas del grupo 5 de trigo. La primera mitad del brazo 7RL es homeóloga de los brazos largos de los cromosomas del grupo 7 de trigo y el extremo distal del 7RL es equivalente a parte de los brazos cortos de los cromosomas del grupo de homeología 2 de trigo. También se conocen las relaciones de sintenia entre los cromosomas de trigo hexaploide con $2n=42$ (tres genomios diferentes A, B y D; cada genomio con 7 cromosomas distintos) y de arroz con $2n = 24$ (12 pares de cromosomas diferentes) (Figura 1.29, Sorrells y col. 2006), entre los cromosomas de trigo y *Brachypodium distachyon* (Figura 30, especie modelo para las Triticineas, totalmente secuenciada) (International Brachypodium Initiative, Nature), entre los de sorgo y arroz (Figura 1.30) y entre los de cebada y *Aegilops tauchii*. La especie

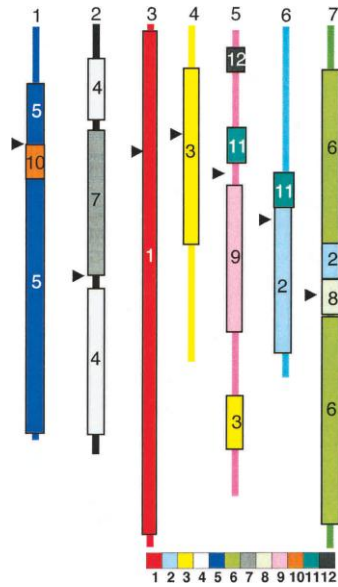


Figura 1.29. Relaciones de sintenia entre los cromosomas de trigo (del 1 al 7) y los de arroz (1 al 12). Se han representado los cromosomas de trigo y en su interior se indican las regiones con equivalencia en arroz. Sorrells y col. (2006).

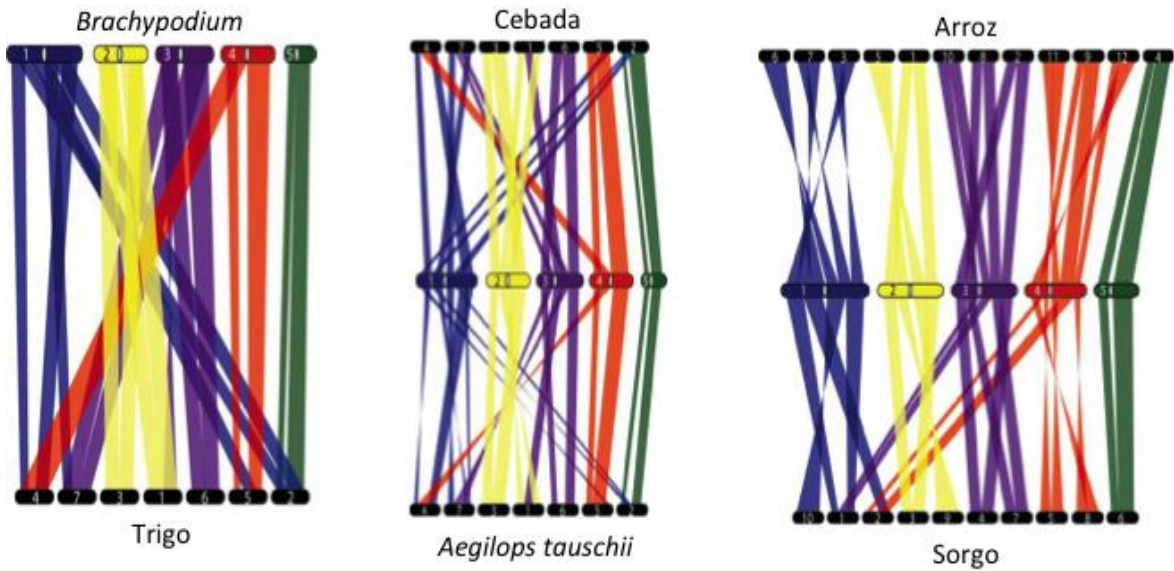


Figura1.30. Relaciones de sintenia entre los cromosomas de *Brachypodium distachyon* y trigo (izquierda), entre cebada, *Brachypodium* y *Aegilops tauschii* (centro) y entre arroz, *Brachypodium* y sorgo (derecha). Procedente de International Brachypodium Initiative, Nature.

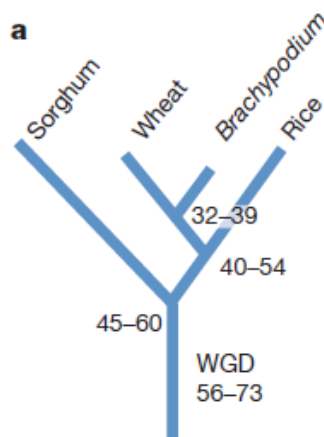


Figura1.31. Relaciones filogenéticas entre Sorgho (Sorghum), trigo, Brachypodium, y arroz. Datos procedentes de International Brachypodium Initiative, Nature.

El tamaño del genoma de centeno (7.917 Mbp, Tabla 1.5) es el más grande dentro de los cereales de clima templado, es un 40% mayor que el genoma del trigo que se utiliza para fabricar pan (*Triticum aestivum* L.). Esta diferencia se debe a la presencia de una gran cantidad de secuencias altamente repetidas. Flavell y col. (1974) estimaron que el contenido de ADN repetido de centeno era un 92%. A pesar de los avances en la tecnología, la secuenciación del genoma de centeno sigue siendo una tarea muy difícil y costosa. Por ejemplo, el brazo corto del cromosoma 1R representa el 5,6% del genoma del centeno y tiene un tamaño de 441 Mbp, por tanto el brazo 1RS es comparable en tamaño al genoma del arroz.

Especie	Número de cromosomas	Tamaño del genoma 1C	Tamaño del genoma 1Cx	Referencia
Centeno	2n = 2x = 14 (RR)	7,917 Mpb	7,917 Mpb	[Doležel y col 1998]
Trigo duro	2n = 4x = 28 (AABB)	12,030 Mpb	6,015 Mpb	[Bennett y Smith 1976]
Trigo blando	2n = 6x = 42 (AABBDD)	16,937 Mpb	5,646 Mpb	[Bennett y Smith 1976]
Cebada	2n = 2x = 14 (HH)	5,100 Mpb	5,100 Mpb	[Doležel y col 1998]

Tabla1.5. Número de cromosomas, tamaño del genoma en millones de pares de bases (Mpb) y publicación en centeno, trigo duro (tetraploide), trigo blando (hexaploide) y cebada.

II. OBJETIVOS

Dado que el centeno es un material vegetal con un elevado grado de tolerancia al estrés por aluminio, que aún se desconoce el grado de variación en los niveles de tolerancia en esta especie y muchos de los genes involucrados en la tolerancia al estrés producido por este metal ligero, en especial de los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos y de los implicados en el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares, los principales objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

- 1.-** Estudio de la variación para el carácter tolerancia al estrés por Al con diferentes métodos en cultivares de centeno (*Secale cereale* L.) de distinta procedencia.
- 2.-** Análisis de la posible relación entre el grado de tolerancia al estrés por Al y la variabilidad en las secuencias de un segmento de la región promotora y en algunos exones del gen de tolerancia *ScALMT1* (transportador de malato activado por Al).
- 3.-** Aislamiento, caracterización, localización cromosómica, estudio de la variabilidad en centeno, en diferentes especies de Poáceas y establecimiento de relaciones filogenéticas de algunos de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos en centeno. En particular, de los genes de málico deshidrogenasa (*MDH*), citrato sintasa (*CS*) y fumarasa (*FUM*) mitocondriales.
- 4.-** Aislamiento, caracterización, localización cromosómica, estudio de la variabilidad en centeno, en diferentes especies de Poáceas y establecimiento de relaciones filogenéticas de un gen involucrado en el mantenimiento de la pared celular, en concreto de Pectin metilesterasa (*PME*).
- 5.-** Análisis de los cambios en la expresión de los ARN mensajeros codificados por los genes de *MDH*, *CS*, *FUM* y *PME*, en raíces y hojas de un cultivar tolerante y una línea sensible, producidos por tratamientos con Al a diferentes tiempos de exposición y a distintas concentraciones.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Vegetal:-

Los materiales vegetales utilizados en este estudio fueron los siguientes:

A) En los diferentes estudios de variabilidad se emplearon genotipos de centeno de diversos orígenes (Figura 3.1 y Tabla 3.1):

	Nombre	Origen
1	305	Afganistán
2	Sornopolevaja	Armenia
3	Saskatoon	Australia
4	46	Brasil
5	70	Bulgaria
6	O. J.	Canadá
7	210	Chile
8	-	China
9	Oiva	Finlandia
10	Petkuser Somerroggen	Alemania
11	Rcat013928	Hungría
12	R192	India
13	153	Irán
14	Irlanda I	Irlanda
15	French	Israel
16	Abruzzi	Italia
17	Kungs	Japón
18	Wir 7041	Kazakstán
19	Kénya	Kenia
20	Centeno Snoopy	México
21	2d174	Nueva Zelanda
22	14210	Pakistán
23	673/78	Portugal
24	Brasov 200-N	Rumanía
25	Radosinske Record	Slovakia
26	Karlshuldska	Eslovenia
27	Korea I	Corea del Sur
28	Cadi	Suiza
29	Tjk03-89	Tayikistán
30	M1-72-73-274	Turquía
31	148	Reino Unido
32	Aroostook	Estados Unidos
33	Centeno de la Estanzuela	Uruguay

Tabla 3.1. Nombres y países del origen de los cultivares de centeno utilizados en los estudios de variabilidad



Figura 3.1: Distribución mundial de los cultivares de centeno utilizados en los estudios de variabilidad.

B) Para identificar los ADNcs de los diferentes genes candidatos en centeno y en los correspondientes estudios de expresión se emplearon las siguientes líneas:

Especies	Cultivar	Grado of tolerancia
<i>Secale cereale</i>	Ailés	Alto
<i>Secale cereale</i>	Riodeva (línea consanguínea)	Bajo
<i>Secale cereale</i>	Imperial	Medio
<i>Secale cereale</i>	Petkus	Alto
<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	Medio
<i>Triticale</i> (\times <i>Triticosecale wittmack</i>)	Chinese Spring - Imperial	Medio

Tabla 3.2. Líneas de Centeno y Trigo utilizadas en este trabajo

C) Para llevar a cabo la localización cromosómica de los genes candidatos se utilizó trigo hexaploide (*Triticum aestivum* cv Chinese Spring, CS), centeno (*Secale cereale* L., cv. Imperial, I), triticale (CS-I) y las líneas disponibles disómicas y ditelosómicas de adición trigo (CS) - centeno (I).

2. Métodos:-

2.1 Test Básico de Tolerancia al Aluminio:-

Para determinar el nivel de tolerancia al aluminio de las diferentes poblaciones de centeno se empleó el test descrito por Gallego y Benito (1997). Cada experimento se realizaba por duplicado. Resumidamente, las semillas se esterilizaban durante 10 min en presencia de HgCl_2 (0.1%), se lavaban con agua desionizada y se incubaban durante dos días en oscuridad, en placa Petri con papel de filtro humedecido y a 20°C de temperatura. Las semillas germinadas se transferían a una malla de nylon flotando en 2.5 L de la solución nutritiva a pH 4,0 (Tabla 3.3) aireada continuamente. Los contenedores con dicha solución se situaban en una cámara de cultivo a 20°C con 16 horas de iluminación al día. Cinco días después, las plántulas se pasaban a una solución nutritiva con Al 150 μM ($\text{AlKSO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) a pH 4,0 durante 24h. Tras el tratamiento con Al las plántulas eran lavadas con agua desionizada durante 2-3 min. Entonces las raíces se teñían con Eriocromo de Cianina R o con hematoxilina.

Compuesto	Fórmula química	g	mM	M
Nitrato potásico	KNO_3	3,29	0,65	101,11
Cloruro de calcio	CaCl_2	2,94	0,40	147,02
Cloruro de magnesio	MgCl_2	2,54	0,25	203,30
Nitrato amónico	NH_4NO_3	0,16	0,04	80,04
Sulfato amónico	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,07	0,01	132,14

Tabla 3.3. Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo hidropónico de centeno (en 1L de agua destilada y desionizada).

2.1.1 Tinción Con Eriocromo Decianina R:-

Se llevaba a cabo la tinción de las raíces con Eriocromo de Cianina R (0,1%) durante 10 min y se lavaban con agua para quitar el exceso de tinte. A continuación las plántulas se transferían a la solución nutritiva sin Al para su incubación durante 48 h. Finalmente, se medían dos parámetros de crecimiento de las raíces, el porcentaje relativo de recrecimiento de la raíz después del tratamiento con Al (RRL) y el porcentaje de Reducción

relativo del crecimiento total de la raíz (RRS) a consecuencia del tratamiento.

$$RRL = \left[\frac{\text{Recrecimiento sin Al} - \text{Recrecimiento con Al}}{\text{Recrecimiento sin Al}} \right] \times 100$$

$$RRS = \left[\frac{\text{Crecimiento total sin Al} - \text{Crecimiento total con Al}}{\text{Crecimiento total sin Al}} \right] \times 100$$

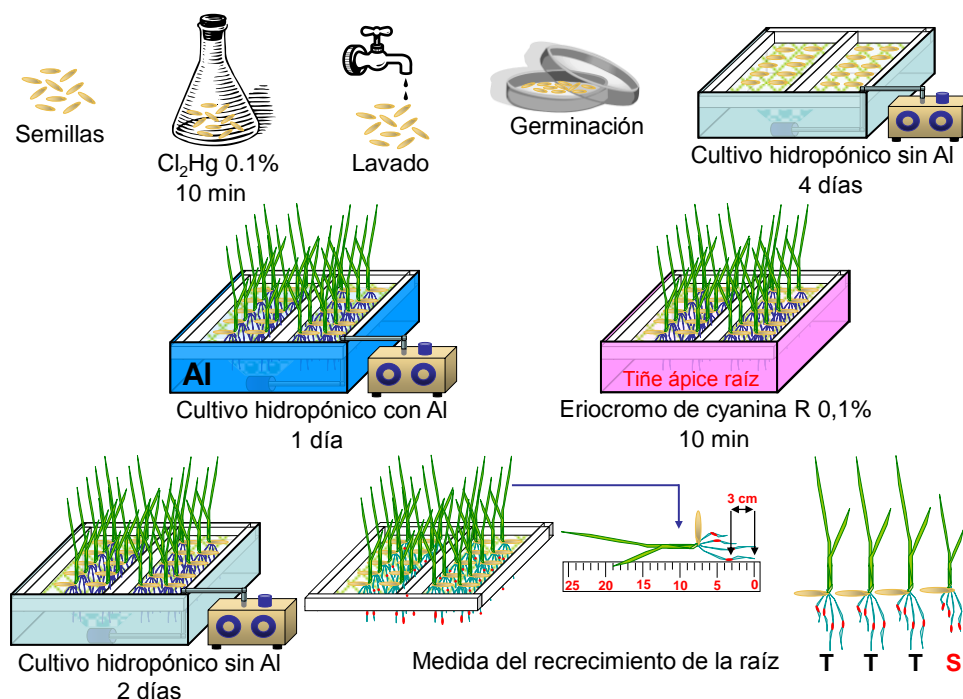


Figura 3.2 pasos del Test de Tolerancia al Aluminio

2.1.2 Tinción Con Hematoxilina:-

En este método de valoración de la tolerancia al Al se empleaba el protocolo de tinción de Polle et al. (1978). Las plántulas se colocaban en agua destilada aireada durante 60 minutos para eliminar el Al en la superficie de la raíz. Se aplicaba una solución con hematoxilina (2g/l) y KIO₃ (0,2g/l) durante 15 minutos y tres lavados de 15 minutos con agua destilada.

Cada planta se clasificó visualmente en función de la intensidad de la tinción de los ápices de las raíces primarias en una escala de 0 a 4, siendo 0 “no teñido” y 5 “máxima tinción”. Las plantas sin tinción se consideraban como tolerantes y las más teñidas como sensibles. Se analizaban dos repeticiones por línea y seis plantas por repetición.

2.2 Test Adicionales De Tolerancia Al Aluminio.-

En este trabajo se ha comparado los test clásicos para el estudio de la respuesta al estrés por aluminio en centeno, anteriormente descritos, con otros métodos. La base en todos los casos es el cultivo hidropónico que acabamos de referir y las diferencias residen en el carácter que se mide en última instancia. En este caso se emplearon únicamente los tres cultivares clasificados como tolerantes según los métodos anteriores y los tres más sensibles.

2.2.1 Distribución Y Acumulación Del Al:-

Se cortaban los ápices de las raíces, se incubaban en de acetato de amonio (NH_4OAc) (5 mM, pH 5,0) durante 10 minutos y finalmente se teñían con Morin (100 mM) durante 1h (Tice et al., 1992). Los ápices teñidos de las raíces se observaban con un microscopio Olympus BX51 (longitud de onda de excitación 420 nm y de emisión de 510 nm).

2.2.2 Visualización de la peroxidación lipídica:-

Los aldehídos producidos en las raíces se pueden visualizar con el reactivo de Schiff según lo descrito por Yamamoto et al. (2001). Las raíces se cortaban y se teñían con el reactivo de Schiff durante 20 minutos. Posteriormente, se incubaban en una solución de sulfito (0,5%), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en HCl (0,05 M). Finalmente se realizaba la observación con un microscopio estereoscópico de luz (Olympus SZX7).

2.2.3 Determinación De La Muerte Celular:-

En este caso se llevaba a cabo una tinción de raíces con azul de Evans (0,025%) en CaCl_2 (100 mM, pH 5,6) durante 10 minutos (Yamamoto et al., 2001) y posterior observación bajo un microscopio óptico (Olympus BX51).

2.3 Aislamiento Y Purificación De DNA:-

La obtención de ADN genómico, destinado a ser usado en experimentos de amplificación, se realizó usando el método Chemagic DNA Plant Kit (Chemagen). El material provenía de plantas individuales o de mezclas de plantas, según el caso, y se procesaba de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.4 Aislamiento Y Purificación De RNA:-

Con el objeto de obtener la secuencia completa del ADNc de diferentes genes candidatos de las líneas de centeno estudiadas se tomó material radicular de una mezcla de 15 plantas de Petkus y 15 de Riodeva que habían sido expuestas a diferentes concentraciones de aluminio en el medio de cultivo hidropónico descrito anteriormente. Este tejido fue macerado en nitrógeno líquido y se extrajo el ARN total de estas plantas usando el kit Trizol (*Invitrogen*).

Para la cuantificación de la expresión de los genes candidatos se obtuvo ARN total procedente de diversas poblaciones de centeno. El procedimiento usado para inducir la expresión génica mediante la exposición a aluminio se describe posteriormente en el apartado de “Análisis de la expresión génica”. Los tejidos vegetales colectados se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron macerados hasta obtener polvo fino, que luego fue almacenado a -80°C hasta su uso. Se extrajo ARN total a partir de estas muestras usando el mismo kit mencionado anteriormente.

2.5 Valoración Y Cuantificación De Ácidos Nucleicos:-

La calidad de los ácidos nucleicos obtenidos se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (BrEt), para comprobar la integridad de las moléculas. La cuantificación de las muestras se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 260/280 nm. Una relación entre 1,8 y 2,0 era la deseable. El ARN extraído para los experimentos de cuantificación de la expresión génica se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop® ND-100 (NanoDrop Technologies).

2.6 Amplificación De Ácidos Nucleicos Por PCR:-

Las amplificaciones de ácidos nucleicos fueron un procedimiento rutinario a lo largo de toda la experimentación que aquí se describe. La PCR fue utilizada con diversos propósitos, entre ellos, la obtención de secuencias específicas, la localización cromosómica de fragmentos, la verificación de insertos en plásmidos, etcétera. Describir las condiciones específicas de cada uno de los experimentos que implicaron la PCR nos parece inadecuado e innecesario. Sin embargo, y de manera general podemos decir que para realizar toda esta gama de amplificaciones fue necesario modificar muchas veces las condiciones y las variables de la reacción en cadena de la polimerasa, así pues lo que se

describe a continuación refleja solamente la generalidad de las reacciones. Los cambios específicos para cada amplificación se detallan en cada caso.

La mezcla de reacción se realizó en volúmenes que iban desde los 10 a los 100 μ l, y contenía unos 20-100 ng de ADN molde, 1X de tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM), 100 μ M de cada dNTP, 5 pmoles de cada cebador, y 0,25 μ l de Taq polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo en dos termocicladores: PTC-100 (MJ Research) y G-Storm I (Gene Technologies Limited).

El programa básico de amplificación fue:

Un paso preliminar de **5 min a 94°C**,

25-35 ciclos compuestos por:

Desnaturalización: **30 s a 94°C**

Hibridación: **30 s a 55-70°C**

Extensión: **2 min a 72°C**

Extensión de **10 min a 72°C**.

Las reacciones fueron refrigeradas hasta su análisis ulterior mediante electroforesis en agarosa al 1,5% y BrEt. El tamaño de los productos fue calculado comparando con un marcador de peso molecular comercial. Los cebadores utilizados para amplificar las secuencias específicas se enumeran en el Apéndice I.

2.7 Clonación Y Secuenciación:-

Los productos de PCR que presentaban un tamaño de acuerdo con lo esperado fueron recuperados de la agarosa mediante extracción física y posteriormente fueron purificados usando dos kits comerciales diferentes: Bioclean kit (*Biotoools*) y DNA gel extraction (*Millipore*). Dichos fragmentos de ADN fueron clonados con el kit TOPO Cloning (*Invitrogen*), según las especificaciones del fabricante. Las colonias de bacterias que contenían el inserto de ADN eran fácilmente identificables por el color blanco que producían en el medio de cultivo LBA (LB + ampicilina) y 40 μ l de X-gal 20 mg/ml.

Para asegurarnos de que las bacterias de las colonias blancas contuvieran el inserto adecuado, se realizaba una PCR con los cebadores M13 contenidos en el kit. Las colonias seleccionadas fueron cultivadas en medio LBA líquido durante 24 horas a 37°C en agitación constante (200 rpm). Luego los plásmidos eran recuperados mediante purificación con el kit High pure plasmid isolation (Roche). Estos plásmidos purificados eran entonces enviados a secuenciar al Servicio de Genómica de la Facultad de Biología de la UCM, o al Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, usando los cebadores universales M13F (-20) y M13R (-24) cuyas dianas estaban contenidas en la secuencia del plásmido.

2.8 Análisis De Secuencias

Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas con el programa Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd). Para confirmar la identidad de las secuencias, así como para comparar secuencias entre sí y las secuencias aminoacídicas derivadas de ellas, se usó la aplicación GenBank BLAST de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El programa Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) fue utilizado para establecer la localización probable de los exones e intrones del gen *ScALMT1* en las secuencias genómicas de centeno.

Con el fin de predecir la estructura de las posibles regiones transmembrana de las proteínas deducidas y para interpretar el efecto de las diferencias en las secuencias de residuos aminoacídicos entre los alelos de cada gen, se utilizaron los programas que se indican en la (Tabla 3.4).

Programa	dirección	Referencia
MEMSAT	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Jones 1999
TMAP	http://www.mbb.ki.se/tmap/index.html	Persson y Argos 1997
TopPred2	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html	Claros y Von Heijne, 1994
HMMTOP	http://www.enzim.hu/hmmtop/	Tusnády y Simon 1998
PHDhtm	http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/	Rost et al 2004
DAS	http://www.enzim.hu/DAS/DAS.html	Cserzo et al 2002
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Krogh et al 2001

Tabla 3.4. Programas utilizados para deducir la estructura de las proteínas estudiadas.

2.9 Identificación De Secuencias Flanqueantes:-

Una vez secuenciados los diferentes ADNcs de los genes en estudio se procedió, en algunos casos, a la secuenciación de los ADNg completos mediante el diseño de cebadores en los exones. Además, se identificaron las secuencias flanqueantes con el kit GenomeWalker kit (*Clontech*). Los cebadores diseñados en cada caso figuran en el Apéndice I. Para ello se digirió el ADN genómico de plantas de centeno, con cuatro enzimas de restricción (DraI, EcoRV, PvuII y StuI) capaces de producir extremos romos. Luego estos productos de digestión fueron ligados a adaptadores especiales incluidos en el kit. Estas “bibliotecas solubles” se amplificaron con la enzima polimerasa Advantage 2 (*Clontech*) y usando cebadores específicos del gen aguas arriba y aguas abajo, más un cebador específico del adaptador, para generar productos de hasta 6 kb.

Los productos de amplificación fueron secuenciados directamente o clonados para su posterior secuenciación. Una vez identificadas las secuencias promotoras, la predicción de motivos con potencialidad de funcionar como reguladores de la transcripción-expresión de los genes se realizó usando varios programas disponibles en la red y enumerados en la (Tabla 3.5).

Programa	dirección	Referencia
McPromoter MM	http://genes.mit.edu/McPromoter.html	Ohler et al 1999, 2001
Promoter Inspector	http://www.genomatix.de/online_help/help_gems/PromoterInspector_help.html	Kondrakhin et al 1995
Dragon Promoter Finder	http://research.i2r.astar.edu.sg/promoter/promoter1_5/DPF.htm	Bajic et al 2002

Tabla 3.5. Programas de búsqueda de motivos reguladores de la transcripción.

Para comparar y alinear las secuencias flanqueantes obtenidas a partir del genoma de diversas especies se utilizó el programa disponible en el sitio <http://genome.lbl.gov/vista/rvista/about.shtml>.

2.10 Análisis de la expresión génica:-

2.10.1 Transcripción Inversa En Ensayos De Expresión Génica:-

El ARN total (1µg) obtenido a partir del procedimiento descrito antes en el apartado “Extracción de ARN” y que contenía los ARN mensajeros fue retrotranscrito a ADNc usando cebadores hexaméricos aleatorios (con el objeto de obtener ADNc tanto de los ARN mensajeros como de los ARN ribosomales,

que servirían posteriormente como genes de referencia en el análisis de cuantificación de la expresión génica) y transcriptasa reversa MMLV (Advantage™ RT-for-PCR kit, Clontech) según las condiciones establecidas por el fabricante.

2.10.2 Exposición De Plántulas Al Aluminio:-

Para inducir la expresión de los genes de tolerancia al aluminio en las diversas plántulas analizadas, se utilizó un método semejante al ya descrito arriba para el test de tolerancia al aluminio pero obviando el paso final de la tinción. Se germinaron y cultivaron semillas desinfectadas de centeno en medio hidropónico en solución nutritiva. Estas semillas se dividieron en 5 grupos que fueron expuestos, durante diversos periodos de tiempo (0 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas), a la presencia de aluminio a 300 μM en solución nutritiva ácida pH 4,0. También se llevaron a cabo experimentos a distintas concentraciones 25, 50, 100 y 300 μM de Al durante 12 horas. Se tomaron muestras de 15 plántulas por tiempo de exposición, de dos tipos de tejido: ápice radicular y hoja en su porción distal. Estas muestras eran inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaban hasta su uso a -80°C .

2.10.3 Determinación De La Expresión Génica Mediante PCR Semicuantitativa:-

Los ADNc obtenidos a partir de los RNAs de plantas tratadas, con y sin Al, se amplificaron para tener una primera aproximación a la expresión génica de los genes estudiados. Los cebadores utilizados (Apéndice I) fueron diseñados entre dos exones diferentes para prevenir la amplificación de ADN genómico. Además se empleó un gen de actina que servía como control endógeno de la expresión. La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 20 μl , con 2 μl de la retrotranscripción RT, 10 μl de Taq PCR Master Mix (*Qiagen*) y 2 μl de cada cebador. Las muestras fueron amplificadas utilizando el siguiente programa: un paso inicial de 3 min a 95°C , 33 ciclos de 20 segundos a 95°C , 30 seg a 58°C y 35 seg a 72°C , seguido por un paso final de extensión de 7 min a 72°C . Las reacciones fueron almacenadas a 4°C . Los productos de PCR se sometían a electroforesis en gel de agarosa al 2,0% y se visualizaban bajo luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio.

2.10.4 PCR Cuantitativa En Tiempo Real Mediante SYBR Green I:-

Para caracterizar con mayor exactitud la expresión de los genes candidatos se empleó el método de PCR cuantitativa con SYBR Green. Se preparaban mezclas de reacción en un volumen final de 20 µl que contenían 10 µl de Fast SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), 6,0 pmol de cada primer y el producto de la transcripción inversa de 200 ng de ARN. Las amplificaciones se realizaban utilizando un termociclador 7900HT (*Applied Biosystems*) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95 °C durante 20 s, seguido de 40 ciclos que constaban de un paso de 1 seg a 95 °C y otro de 20 seg a 60 °C.

Todas las muestras, controles y diluciones se preparaban por duplicado en placas de 96 pocillos ópticos MicroAmp (*Applied Biosystems*) según lo recomendado por el fabricante. En cada placa siempre se incluían dos bancos de diluciones, uno para el gen diana y otro para el gen 18S ribosomal como referencia, que permitía la cuantificación del transcrito problema en cada caso. En las placas, además se incluían los controles sin retrotranscrito (No Template control, NTC) con el fin de detectar alguna contaminación por presencia de ADN genómico que no hubiera sido degradado durante el proceso de extracción.

2.10.5 Análisis De Las PCRs Cuantitativas En Tiempo Real:-

La medición de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real es una cuantificación relativa, que normaliza la expresión del gen en estudio con la expresión de un control endógeno (en este caso del gen ribosomal 18S). La curva de amplificación de cualquier PCR se compone de tres segmentos: una fase inicial donde comienza detectarse la fluorescencia, una fase de crecimiento exponencial y una fase final de meseta. Durante la fase exponencial de la amplificación, la reacción puede ser descrita matemáticamente como:

$$X_n = X_0 \cdot (1 + E_x)^n$$

Donde:- X_n es el número de moléculas que se amplifica en el ciclo n ; X_0 es el número inicial de moléculas, E_x es la eficiencia de la amplificación y n es el número de ciclos.

La eficiencia de la amplificación de una secuencia diana específica se puede calcular de forma experimental. Para ello, a partir del producto de la

transcripción inversa se realizan curvas de calibración por duplicado y con cuatro diferentes diluciones, para el gen en estudio y para el control endógeno. La eficiencia de amplificación en porcentaje se calcula por interpolación del valor de la pendiente de la recta de regresión de las diluciones, para cada gen, en la siguiente ecuación:

$$E_X = \left(10^{-\frac{1}{m}} - 1\right) \cdot 100$$

Donde:- E_X es la eficiencia de la amplificación y m es la pendiente de la recta.

Dado que las eficiencias de amplificación de los genes de interés y del control 18S fueron altas (pendiente de la recta de regresión $< 0,1$) y equiparables, se pudo utilizar el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001), que se resume en las siguientes expresiones algebraicas:

$$\Delta C_{T-Al} = C_{T-Al}(GI) - C_{T-Al}(18S)$$

$$\Delta C_{T+Al} = C_{T+Al}(GI) - C_{T+Al}(18S)$$

$$\text{Inducción por Al} = 2^{-(\Delta C_{T+Al} - \Delta C_{T-Al})}$$

Donde:- C_T es el ciclo en el que comienza a observarse fluorescencia (Cycle Threshold) y está directamente relacionado con la cantidad de partida de transcrito. Así, $C_{T+Al}(GI)$ y $C_{T-Al}(GI)$ son los valores de C_T para el gen de interés en presencia y ausencia de Al, respectivamente; y $C_{T+Al}(18S)$ y $C_{T-Al}(18S)$ son los valores de C_T para el gen 18S en presencia y ausencia de Al, respectivamente.

IV. RESULTADOS

1. Evaluación De La Tolerancia Al Aluminio Mediante Cultivo Hidropónico En Una Colección De Cultivares De Centeno:-

El principal objetivo de la primera parte de este trabajo ha consistido en estudiar la variabilidad para la respuesta al estrés por aluminio en **34** cultivares de centeno. Los experimentos se llevaron para evaluar los cambios que se producen en las raíces a consecuencia del tratamiento con Al y la capacidad de las raíces para tolerar la toxicidad causada por el Al.

1.1. Evaluación de tolerancia de los genotipos mediante estimación del crecimiento de las raíces:-

La estimación del grado de tolerancia de los 34 cultivares empleados se ha llevado a cabo en cultivo hidropónico utilizando una concentración de 150 μM de AlCl_3 en la solución nutritiva. Esta concentración es bastante elevada comparada con la empleada en otras especies de Triticineas como trigo y cebada. En centeno, sin embargo, dado que es una especie muy tolerante al estrés por Al, se trata de una concentración no muy alta que permite distinguir entre cultivares tolerantes y sensibles (Gallego y Benito 1998). El primer síntoma aparente de la toxicidad por aluminio es la inhibición de la elongación de las raíces, como ha sido demostrado previamente por otros autores en diferentes especies vegetales (Kochian, 1995). Por este motivo, en nuestro estudio hemos analizado, en primer lugar, dos parámetros de crecimiento de las raíces, el porcentaje relativo de recrecimiento de la raíz después del tratamiento con Al (RRL) y el porcentaje de Reducción relativo del crecimiento total de la raíz (RRS) a consecuencia del tratamiento. Ambos estimadores son básicamente dos parámetros de crecimiento que han demostrado correlación con la fitotoxicidad debida al aluminio en diferentes especies vegetales. La variabilidad detectada entre los cultivares se ha estudiado mediante análisis estadístico y los resultados muestran (Tabla 4.1) que existe una diferencia muy significativa entre los genotipos tolerantes (6, 19 y 23) y los genotipos sensibles (2, 21 y 29) en todos los aspectos analizados. La forma de estimar ambos parámetros ha sido la siguiente:

$$RRL = \left[\frac{\left(\text{Recrecimiento sin Al} - \text{Recrecimiento con Al} \right)}{\text{Recrecimiento sin Al}} \right] \times 100 \quad RRS = \left[\frac{\left(\text{Crecimiento total sin Al} - \text{Crecimiento total con Al} \right)}{\text{Crecimiento total sin Al}} \right] \times 100$$

Posteriormente, hemos estudiado un tercer parámetro, HS, que está basado en un método de tinción con hematoxilina.

Tabla 4.1. Valores medios de tres replicas independientes. Porcentaje del recrecimiento de las raíces después del tratamiento (RRL), Porcentaje de reducción del crecimiento total de las raíces (RRS) y tinción con hematoxilina (HS). -Al = sin tratar con Al, +Al = tratadas con Al. Los genotipos se han ordenado de mayor a menor grado de tolerancia para RRS y RRL. Hay tres genotipos (1, 14 y 23) con RRL negativos (recrecen más con Al que sin Al).

		Recrecimiento				Crecimiento total				
Genotipos		-AL	+AL	Diferencia	RRL %	-AL	+AL	Diferencia	RRS %	HS
Tolerante	23	61	62	-0,6	-1	233	226	6,7	3	0.15
	19	56	54	2,3	4	237	228	9,2	4	0.85
	6	59	51	8	14	231	220	11,5	5	0.94
	10	29	22	7,6	26	117	110	7,6	6	1.53
	4	44	33	10,7	24	181	165	16,7	9	1.24
	14	35	44	-8,7	-25	169	153	15,9	9	1.60
	5	46	36	9,4	21	205	185	20	10	2.01
	9	58	43	15,1	26	229	205	24,2	11	1.77
	8	49	42	7,5	15	209	186	23	11	1.09
	27	43	14	29	67	221	197	24,5	11	1.66
	26	43	35	7,5	18	209	186	23,7	11	1.68
	32	55	20	35	64	218	192	25,4	12	1.61
	24	40	32	8,5	21	137	121	16,3	12	1.22
	25	30	22	7,5	25	143	126	17,2	12	2.45
	33	44	36	8,2	19	205	180	25,1	12	2.28
Moderado	17	26	15	10,3	40	108	94,4	13,3	12	1.56
	16	51	36	14,4	29	209	182	26,8	13	2.41
	12	40	33	7,3	18	148	129	19,2	13	2.55
	11	57	43	14,2	25	212	184	27,8	13	2.40
	15	40	34	5,5	14	178	154	24,4	14	2.33
	20	52	45	7,3	14	229	197	32	14	2.56
	1	32	34	-2,4	-8	158	135	23,2	15	3.15
	3	48	27	20,9	43	169	143	25,4	15	2.40
	7	46	40	5,5	12	214	181	32,9	15	2.26
	18	34	22	12,3	36	139	117	22,2	16	2.75
	31	50	33	16,5	33	182	150	31,1	17	3.52
	34	25	15	9,9	39	90,3	73,7	16,6	18	2.00
	13	52	43	9,3	18	210	170	40,4	19	3.04
	22	31	21	9,6	31	124	99,7	24,5	20	3.37
	30	45	18	27,4	61	176	139	36,4	21	2.75
Sensible	28	37	26	10,3	28	156	111	44,8	29	3.34
	29	51	14	37,6	73	159	111	47,5	30	3.54
	21	41	11	30,8	74	119	76,5	42,2	36	3.83
	2	56	0	55,9	100	143	86,8	55,9	39	4.0

En el caso del parámetro **RRL** (la longitud relativa del rebrote de la raíz tras la incorporación de aluminio a la solución), pudimos comprobar que los genotipos 1, 14 y 23 (señalados en rojo en la Tabla 4.1) presentaron las tasas

más altas de recrecimiento tras la adición del aluminio, mientras que los genotipos 2, 21 y 29 fueron los más afectados por este tipo de estrés (Tabla 4.1).

La estimación del segundo parámetro (**RRS**-Reducción relativa del crecimiento total de la raíz en %) originó resultados semejantes a los del primero. Los genotipos analizados mantenían el mismo comportamiento que en el caso del parámetro anterior (**RRL**), esto es, los genotipos 6, 19 y 23 presentaron las tasas más bajas de reducción del crecimiento radicular (**RRS**) bajo estrés por aluminio, mientras que los genotipos 2, 21 y 29 mostraron los niveles más altos de reducción (Tabla 4.1 y Figura 4.1).

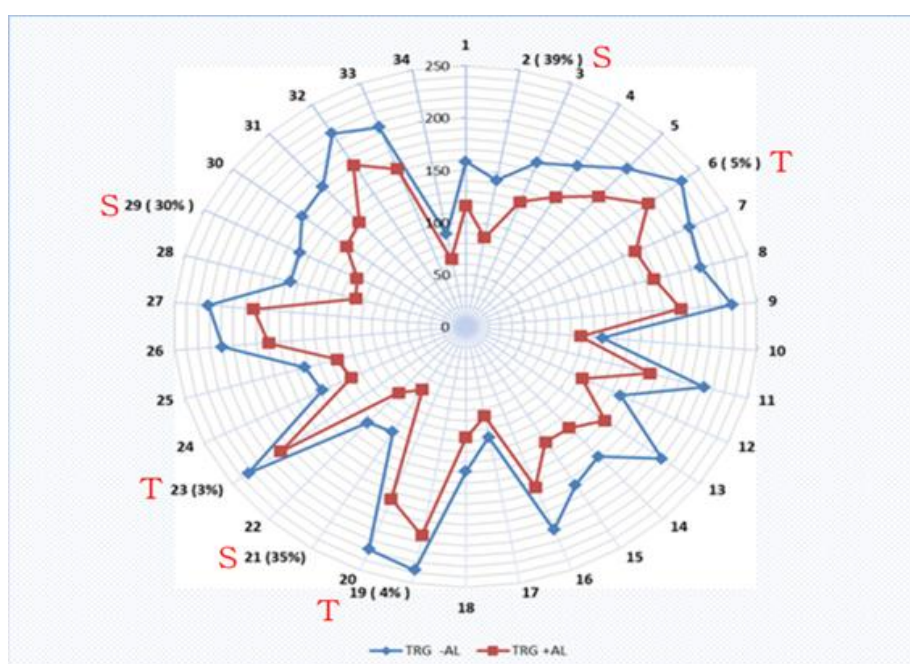


Figura 4.1. Longitud total de las raíces sin Al (TRG -Al, línea de color azul) y con Al (TRG +Al, línea de color rojo). Se han destacado con texto en color rojo los tres genotipos tolerantes (T) y tres sensibles (S). Entre paréntesis se ha indicado el porcentaje de reducción relativa del crecimiento total de la raíces (RRS).

Por lo tanto, de acuerdo con el parámetro **RRS**, podemos dividir los cultivares estudiados en tres grupos: uno muy tolerante (genotipos 6, 19 y 23), otro sensible (genotipos 2, 21 y 29) y un tercer grupo moderadamente tolerante (el resto de cultivares). El orden según el nivel de tolerancia (respuesta al estrés por aluminio) se mantiene para los cultivares sensibles con ambos parámetros (RRL y RRS), pero en el caso de los cultivares tolerantes 1 y 14, el nivel de tolerancia difiere cuando se estima el parámetro **RRL** (resaltados en rojo en la Tabla 4.1).

1.2. Tinción con hematoxilina:-

Además de la inhibición del crecimiento de las raíces también hemos estimado la acumulación del Aluminio en las mismas mediante tinción con hematoxilina. La hematoxilina se une al aluminio produciéndose una tinción púrpura que aumenta en intensidad proporcionalmente a medida que aumenta la cantidad de Al acumulado en las raíces. Después del tratamiento con Al se asignó a los cultivares un valor del 0 al 4 según el grado de tinción de las raíces: sin tinción (valor 0), 25% de tinción (valor 1), 50% de tinción (valor 2), 75% de tinción (valor 3) y 100% de tinción (valor 4). Se analizaron entre cinco raíces por planta y tres réplicas de diez plantas para cada genotipo. El valor HS es la media de las tres replicas de seis plantas cada una (Tabla 4.1). Los resultados presentados en la Tabla 4.1 y en la Figura 4.2 muestran diferencias en el comportamiento de los genotipos después del tratamiento con Al. Los genotipos sensibles (2, 21 y 29) presentaron ápices radiculares muy teñidos, mientras que los genotipos tolerantes (6, 19 y 23) mostraron los valores más bajos de este parámetro.

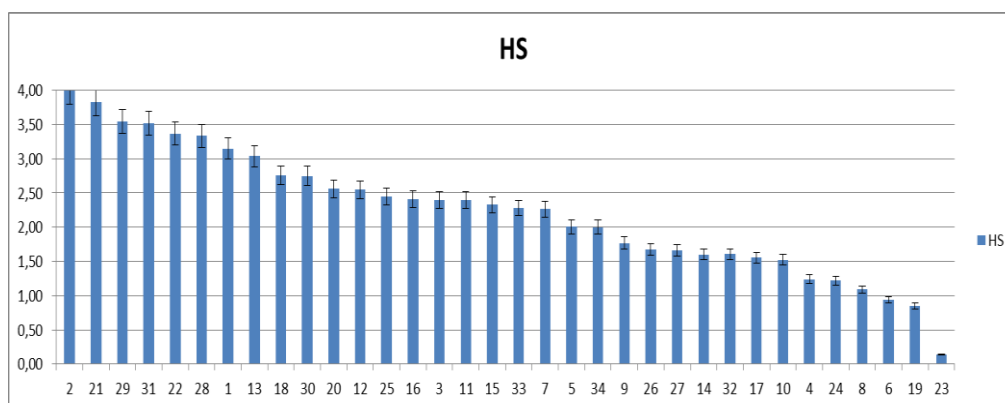


Figura 4.2. Grado de tinción con hematoxilina en las raíces después de la exposición a 150 μ M de Al durante 24 horas. Los valores son las medias de tres repeticiones. En cada ensayo se analizaron 5 raíces de cada planta y 10 plantas de cada genotipo o cultivar. Después del tratamiento con Al se asignó a los cultivares un valor del 0 al 4 según el grado de tinción de las raíces: sin tinción (valor 0), 25% de tinción (valor 1), 50% de tinción (valor 2), 75% de tinción (valor 3) y 100% de tinción (valor 4).

Por otra parte, una simple inspección visual de los ápices teñidos de las raíces reveló que la tinción con hematoxilina es suficiente para discriminar entre los genotipos sensibles y tolerantes tras una exposición de las plantas durante 24 horas a una concentración 150 μ M de aluminio en la solución nutritiva (Figura 4.3). Los cultivares sensibles mostraron una intensa coloración púrpura de las raíces junto con una degradación epidérmica muy marcada

que se extendía desde la zona de elongación hasta la punta de la raíz (ápice). Por el contrario, los cultivares tolerantes no mostraron estos signos de daño en la epidermis de la raíz, si bien una región en la parte anterior al ápice mostró un estrechamiento con un color púrpura intenso. Sin embargo, no se detectó ningún daño físico en la zona de la constricción. En la Figura 4.3 D, E y F puede observarse que los cultivares 2, 21 y 29 presentaron una mayor tasa de acumulación de aluminio en las raíces que los cultivares 6, 19 y 23 (Figura 4.3 A, B y C).

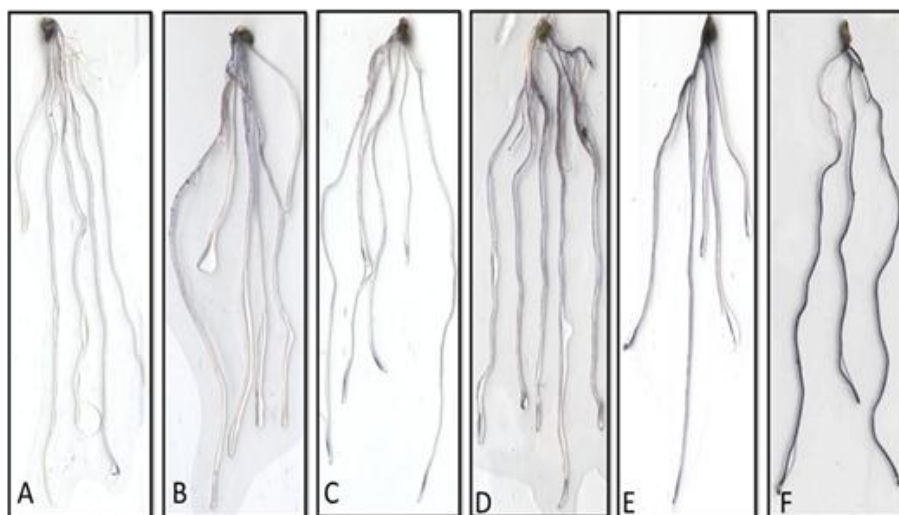


Figura 4.3. Grado de tención con hematoxilina en la raíz después de la exposición a 150 μ m de Al. Los cultivares tolerantes son (A, B, C) y los cultivares sensibles son (D, E, F).

Este método de tinción también permite clasificar a los cultivares en tolerantes (6, 19 y 23) y sensibles (2, 21 y 29). La clasificación obtenida con hematoxilina concuerda bastante bien con la llevada a cabo mediante los parámetros RRL y RRS. Sin embargo, en los cultivares con tolerancia intermedia, la clasificación por grado o nivel de resistencia al estrés por Al obtenida con el parámetro HS no concuerda totalmente con la alcanzada utilizando los parámetros RRL y RRS. Aunque, como veremos más adelante el grado de correlación entre estos parámetros es bastante elevado.

1.3. Correlación entre los diferentes parámetros utilizados para estimar la tolerancia:-

Para estimar el grado de coincidencia en las clasificaciones de tolerancia con los tres parámetros utilizados (RRS, RRL y HS) se calcularon los coeficientes de correlación entre los tres parámetros de tolerancia (Tabla 4.2 y Figura 4.4).

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron significativos en todos los casos (con valores de $P < 0.001$ y de $r > 0.5$). Por tanto, estos resultados confirman nuestra clasificación previa de los cultivares.

Entre **HS** y **RRL** se estimó una correlación $r=0,56$, entre **HS** y **RRL** una correlación de $r=0,82$ y entre **RRL** y **RRS** una correlación de $r=0,68$ (Tabla 4.2). En la Figura 4.4 (A, B y C) se observa la misma tendencia a través de las comparaciones gráficas entre cada par de caracteres, **HS** y **RRS** (Figura 4.4 A), **HS** y **RRL** (Figura 4.4 B) y entre **RRS** y **RRL** (Figura 4.4 C). Muestra la misma tendencia: Un bajo porcentaje de **HS** conlleva un bajo porcentaje de **RRS**, mientras que entre **RRL** y **RRS** un bajo porcentaje de **RRL** conlleva un alto porcentaje de **RRS**, y entre **HS** y **RRL** un bajo porcentaje de **RRL** conlleva un alto valor de **HS**.

Tabla 4.2. Coeficientes de correlación simple entre las tres parejas posibles de los parámetros estudiados (P -value * <0.05 ** <0.01).

	HS	RRL
RRL	0,5589	
RRS	0,8227	0,6825

Los cultivares estudiados pueden y clasificarse en tres grupos de acuerdo con los porcentajes de **RRS** y considerando el grado de tinción con hematoxilina (**HS**) como el criterio de clasificación. Estos tres grupos son: grupo tolerante (6, 19 y 23), grupo sensible (2, 21 y 29) y el resto de los cultivares que serían moderadamente tolerantes.

El método de tinción con hematoxilina sigue siendo uno de los métodos más atractivos para evaluar un número elevado de plantas ya que se trata de una técnica rápida, económica y sencilla de monitorizar y presenta una elevada correlación con **RRL**. El método basado en estudiar el crecimiento de la raíz es más laborioso ya que la longitud de la raíz de cada planta debe ser determinada antes y después del tratamiento con aluminio.

1.4. Otros métodos de tinción que permiten evaluar la acumulación de aluminio y los daños que produce en las raíces:-

Además de los métodos anteriores, hemos empleado otros sistemas de tinción histoquímicos que permiten estimar la acumulación de aluminio (tinción con morin) algunas de las consecuencias del estrés por Al en las raíces de los cultivares tolerantes y sensibles. Las raíces de los cultivares de centeno fueron

tratadas con AlCl_3 a una concentración de $300\mu\text{M}$ en solución nutritiva (pH 4.0) durante 24 horas. Los tres métodos de tinción empleados son indicadores

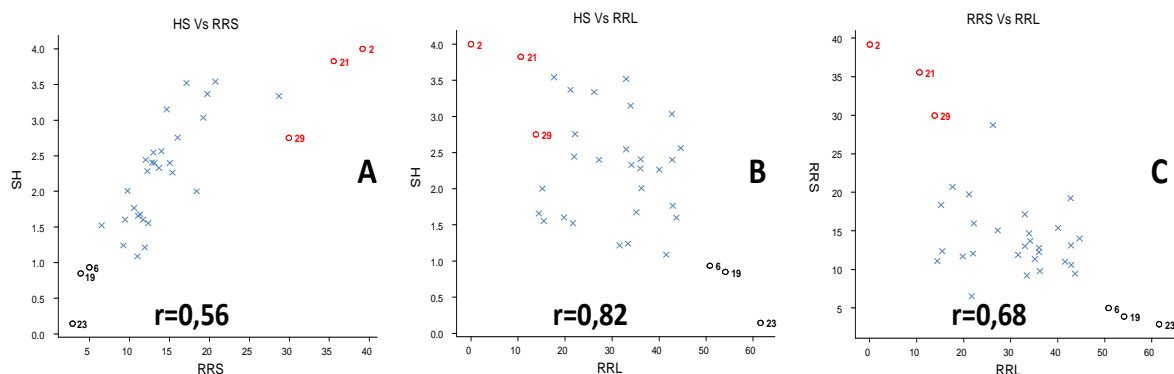


Figura 4.4. Correlación entre los parámetros RRS, RRL y HS. A) Correlación entre HS y RRS. B) Correlación entre HS y RRL y, C) Correlación entre RRS y RRL. En color rojo se han indicado los cultivares sensibles, en color negro los tolerantes y en azul los intermedios.

de acumulación de aluminio (tinción con Morín), peroxidación lipídica (tinción con el reactivo de Schiff) y producción de H_2O_2 (tinción con DCF-DA). Dos de los métodos utilizados detectan estrés oxidativo que se produce por la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), como la peroxidación lipídica y la formación de agua oxigenada (H_2O_2). Los resultados de las tres tinciones se analizaron exclusivamente en el ápice de la raíz (desde la punta [0 mm] hacia la región basal [aproximadamente 7 mm]).

1.4.1. Evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS):-

La producción de especies reactivas de oxígeno en las raíces se estimó empleando el reactivo fluorescente DCF-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) que es indicativo de la acumulación de H_2O_2 . La fluorescencia emitida por el DCF-DA fue muy baja en todos los cultivares tolerantes (Figura 4.5 A, B y C), mientras que la fluorescencia de los ápices de las raíces de los cultivares sensibles fue bastante patente y se observaba de forma muy clara (Figuras 4.5 D y E). Las raíces del cultivar de centeno Petkus (tolerante a la exposición de AlCl_3 - Figura 4.5 F) y de cebada (sensible a la exposición a AlCl_3 - Figura 4.5 G) fueron empleadas como controles.

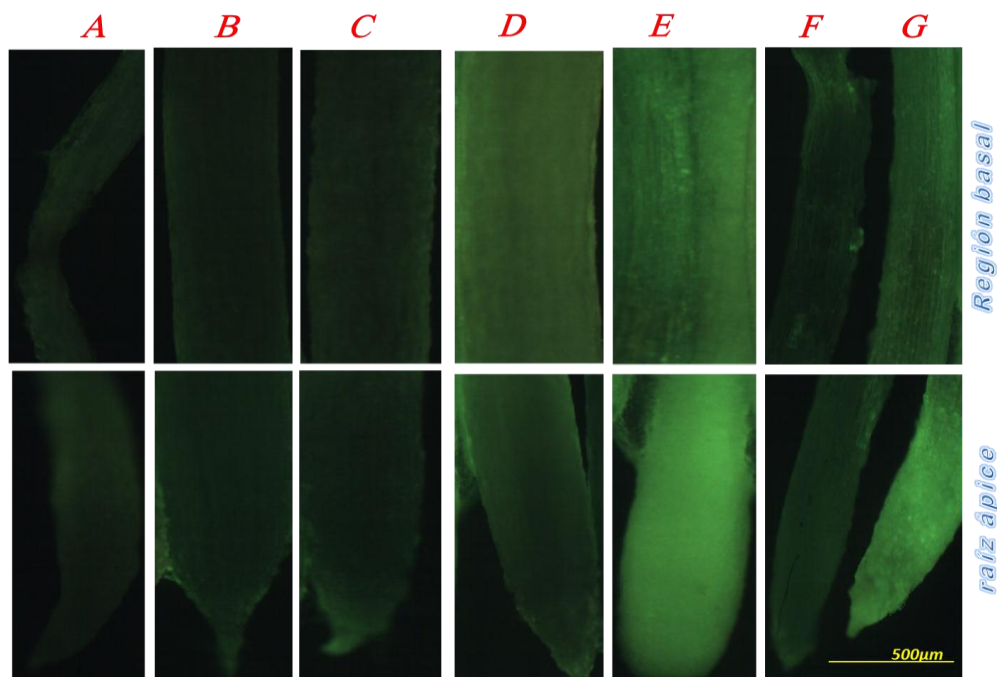


Figura 4.5. Tinción histoquímica con el reactivo DCF-DA (2', 7'-diclorofluoresceína diacetato) para estimar la producción de H_2O_2 y su localización en las raíces (ápice y región basal). Las plantas de centeno fueron tratadas con aluminio a una concentración de 300 μM . Cultivares tolerantes: 23 (A), 19 (B) y 6 (C). Cultivares sensibles: 21 (D) y 2 (E). Controles: Petkus (F) y cebada (G). La barra representa, en cada imagen, 500 μm .

1.4.2. Peroxidación lipídica:-

Los niveles diferenciales de aldehídos que llevan a la peroxidación lipídica (LOOH-derivados aldehídos) pueden visualizarse en tejidos de plantas empleando el reactivo de Schiff (Yamamoto y col., 2001; Han y col., 2008). Tras el tratamiento con $AlCl_3$, se detecta una fuerte coloración rosa en cebada (utilizada como control - Figura 4.6 G), mientras que no se observó coloración alguna en el cultivar tolerante de centeno Petkus (Figura 4.6 F).

Tras la exposición a $AlCl_3$ durante 24 horas, las raíces de los cultivares sensibles se tiñeron claramente de color rosa, principalmente alrededor de la zona de elongación, indicando que la producción de aldehídos (la peroxidación lipídica) estaba teniendo lugar en la misma región que la producción de H_2O_2 . Las raíces de los cultivares tolerantes 6, 19 y 23 (Figura 4.6 A, B y C) no mostraban prácticamente coloración rosa mientras que las raíces de los cultivares sensibles 2 y 21 (Figura 4.6 D y E) estaban bastante teñidos en el ápice. Por tanto, el tratamiento con Al produce la aparición de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica especialmente en los cultivares sensibles. Por tanto, los cultivares tolerantes parecen estar mejor protegidos contra el estrés oxidativo que produce el tratamiento con Al.

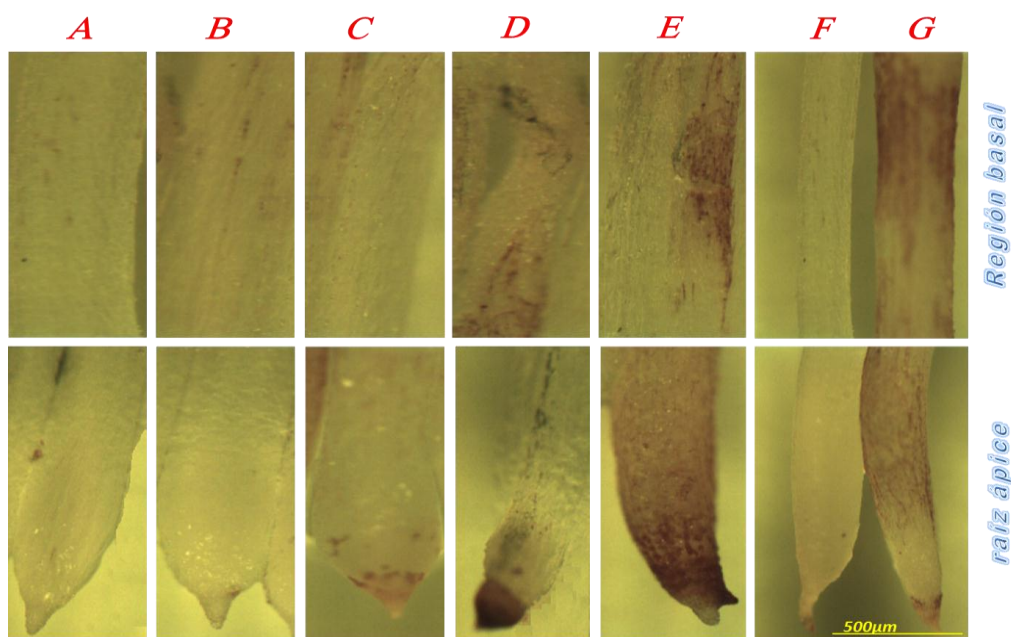


Figura 4.6. Tinción histoquímica con el reactivo de Schiff para el análisis de la peroxidación lipídica causada por el aluminio en las raíces (punta y región basal). Las raíces de las plantas de centeno fueron tratadas con aluminio a una concentración de 300 μM . Cultivares tolerantes: 23 (A), 19 (B) y 6 (C). Cultivares sensibles: 21 (D) y 2 (E). Controles: Petkus (F) y cebada (G). La barra representa, en cada imagen, 500 μm .

1.4.2. Contenido y localización del aluminio:-

Con el fin de estudiar el contenido y la localización del aluminio en las raíces tanto de los cultivares tolerantes como sensibles, se determinó la presencia de iones Al^{3+} en las raíces mediante el empleo del reactivo Morin (Tice y col., 1992), que presenta una alta especificidad por los iones Al^{3+} y es utilizado habitualmente para detectar aluminio en tejidos de plantas (Larsen y col., 1996; Jones y col., 2006; Ezaki y col., 2007). Las raíces de los cultivares sensibles 21 y 2 se tiñeron intensamente, indicando una alta tasa de penetración del aluminio, mientras que los cultivares sensibles 23, 19 y 6 mostraron una menor intensidad de tinción y un patrón totalmente diferente de penetración de aluminio (Figura 4.7).

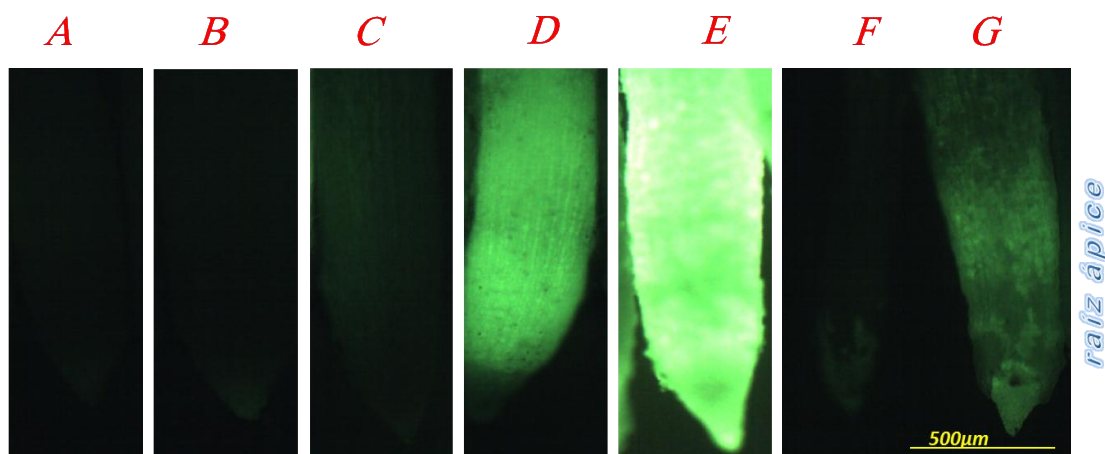


Figura 4.7. Tinción histoquímica con el reactivo Morin para el análisis del contenido y la localización del aluminio en las raíces (punta y región basal). Las plantas de centeno fueron tratadas con aluminio a una concentración de 300 μ M. Cultivares tolerantes: 23 (A), 19 (B) y 6 (C). Cultivares sensibles: 21 (D) y 2 (E). Controles: Petkus (F) y cebada (G). La barra representa, en cada imagen, 500 μ m.

Por tanto, los resultados obtenidos con todos los métodos utilizados para evaluar la tolerancia al Aluminio, indican que los cultivares tolerantes están mejor preparados fisiológicamente ya que soportan mejor el estrés oxidativo producido por los tratamientos y el Al penetra menos en sus raíces.

2. Genes Relacionados Con La Tolerancia Al Estrés Por Aluminio En Centeno:-

La forma en la que el aluminio produce fitotoxicidad en los vegetales y los mecanismo de resistencia desarrollados por la plantas aún no se conocen con claridad. Cómo vimos en la introducción, existe una serie de genes que podrían estar potencialmente involucrados en los procesos de defensa de las plantas frente al estrés por aluminio. Con el fin de conocer mejor la respuesta a este tipo de estrés hemos escogido para nuestro estudio varios genes candidatos que podrían estar potencialmente implicados en la tolerancia. Por tanto, otro de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar los genes que pudieran ser responsables de la tolerancia del centeno al estrés causado por el aluminio.

2.1. Análisis de la diversidad del gen ScALMT1 en diferentes cultivares de Secale cereale:-

El gen *ScALMT1*, que codifica para un transportador de malato activado por Al, es el gen candidato mejor caracterizado en centeno hasta la fecha (Fontecha y col2007). En centeno, se ha observado que el gen *ScALMT1* se

expresa principalmente en el ápice de la raíz y que se induce en presencia de aluminio.

Fontecha y col. (2007) han descrito una expresión cinco veces superior de este gen en genotipos resistentes al aluminio en comparación con genotipos no resistentes. Sin embargo, la variabilidad de este gen en centeno ha sido aún poco estudiada. Por tanto, hemos estudiado la variabilidad de una región del promotor de 738 pb de *ScALMT1* así como la de los exones 1 (276 pb) y 6 (399 pb) y la del intrón 5 (109 pb) (Tabla 4.3).

Las secuencias de la región promotora analizada, de los exones 1 y 6 y del intrón 5 se obtuvieron mediante amplificación con parejas de “*primers*” específicos y posterior secuenciación de los productos de PCR. En varios de los cultivares analizados se detectaron una o más posiciones en las que aparecían simultáneamente dos picos de igual altura en el electroferograma correspondiente a su secuencia. La existencia de estos picos puede tener al menos dos interpretaciones. Si suponemos que existe una sola copia por genoma de la región estudiada, puede tratarse de cultivares o genotipos que sean heterocigotos en esa posición o posiciones. Si suponemos que existe más de una copia por genoma de la región analizada, podría tratarse de genotipos heterocigotos o bien de genotipos con al menos dos copias diferentes de la región estudiada.

En la (Tabla 4.3) podemos observar el número de cultivares o genotipos que muestran al menos una posición con dos picos de igual altura en el electroferograma. Para la región promotora se estudiaron 28 cultivares diferentes de centeno, pero para los exones 1 y 6, y para el intrón 5 pudimos obtener 35 secuencias diferentes (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Cultivares en los que se ha detectado al menos una posición con dos picos de igual altura en los electroferogramas.

	Promotor (738 pb)	Exón 1 (276 pb)	Intrón 5 (109 pb)	Exón 6 (366 pb)
Cultivares	3, 4, 5, 9, 10, 13, 18, 19, 20, 22, 25, 33	3, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 25, 29, 34, 47	20, 24, 25, 40	4, 7, 13, 17, 20, 24, 25, 26, 40, 42
Nº de cultivares	12	11	4	10
Total cultivares	28	35	35	35

También, hemos analizado la variabilidad en una parte de la región promotora (738 pb), de los exones 1 (276 pb) y 6 (366 pb) y de el intrón 5 (109 pb) de distintos genotipos con el programa DNAsp v5. En la Tabla 4.5 aparecen los resultados obtenidos resumidos. Las regiones con mayor diversidad

nucleotídica (π) fueron el intrón 5 y el promotor. La mayor diversidad haplotípica se detectó también en la región promotora. Igualmente la región en la que se han detectado mayor número de inserciones y deleciones es la zona del promotor analizada (9 Indels).

Tabla 4.4. Variabilidad detectada en diferentes genotipos o cultivares de centeno en parte de la región promotora, en los exones 1 y 6 y en el intrón 5.

	Promotor	Exón 1	Exón 6	Intrón 5
Nº total de secuencias (cultivares)	28	35	35	35
Nº total de posiciones o sitios	738	276	399	109
Indels (Inserciones/deleciones)	9	1	0	1
Sitios invariables (monomórficos)	665	268	378	105
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	59	5	21	3
Sitio variable (<i>singleton</i>)	36	2	12	0
Sitios parsimónicos	23	3	9	3
Número de haplotipos, h	22	7	14	5
Diversidad haplotípica	0,958	0,612	0,827	0,751
Diversidad nucleotídica, π	0,00984	0,00373	0,00631	0,01223
Nº total cambios sinónimos	-	2	4	-
Nº total cambios no sinónimos	-	3	17	-

Por el momento, no se ha detectado ninguna relación entre la variabilidad detectada en las regiones analizadas y la tolerancia al aluminio. Es decir, los cultivares tolerantes y los sensibles no muestran diferencias en las secuencias estudiadas que puedan sustentar el distinto grado de tolerancia al estrés por Al que muestran.

2.2. Identificación y caracterización de algunos genes mitocondriales involucrados en el metabolismo de ácidos orgánicos exudados por las raíces en respuesta al estrés por Al:-

Las enzimas que intervienen en la cadena transporte electrónico y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) suelen alterarse cuando las plantas se someten a distintos tipos de estrés. La toxicidad por metales, el estrés oxidativo y el estrés por sequía (estrés hídrico) se sabe que inducen numerosas reconfiguraciones metabólicas con el fin de mantener la producción energética o modular el ambiente redox celular y la supervivencia del organismo (Fedotcheva y col2006, Mailloux y col2007, Lemire y col2008, Atkin y Macherel 2009). También se ha observado que diferentes microorganismos, plantas y animales alteran la actividad de las enzimas mitocondriales de la cadena de transporte electrónico en respuesta al estrés por Al (Benítez y col 2008, Kumar y col 2008, Mailloux y col 2008). Algunos

aniones orgánicos, cómo por ejemplo, citrato, malato, malonato y oxalato, están directa o indirectamente involucrados en muchos procesos metabólicos y en la producción de energía como productos intermedios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

Dado que uno de los mecanismos más importantes de tolerancia en las especies vegetales es la exudación de málico y cítrico por las raíces, hemos decidido aislar y caracterizar algunos genes relacionados con el metabolismo de estos ácidos. Muchas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los ácidos orgánicos tienen al menos dos formas distintas, una de localización citosólica y otra de localización mitocondrial. El metabolismo mitocondrial es muy importante para una variedad de procesos diferentes en las plantas superiores, incluyendo la producción de ATP, fotorrespiración y la formación de precursores para la síntesis de aminoácidos (Moore y Beechey 1987, Douce y Neuburger 1989, Reesap 1990, Raghavendra y col 1994). Igualmente, una parte muy importante de la producción de ácidos orgánicos reside en la mitocondria y, por tal motivo, hemos decidido aislar y caracterizar los genes para dos enzimas mitocondriales de Malato Deshidrogenasa (*ScMDH1* y *ScMDH2*), un gen para una enzima de Citrato Sintasa (*ScCS*) y otro gen para una enzima de Fumarasa (*ScFUM*).

2.2.1. Identificación y caracterización de dos genes de Malato Deshidrogenasa Mitocondrial (*ScMDH1* y *ScMDH2*) en centeno:-

2.2.1.1. Aislamiento y secuenciación de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2*:-

A partir de las secuencias de los ADNc Os05g0574400 (*OsMDH1*) y Os01g0649100 (*OsMDH2*) de arroz, y AK250977.1 y AK252534.1 de cebada, que codifican para las enzimas MDH1 y MDH2 mitocondriales, diseñamos dos pares de “*primers*” en regiones conservadas con el fin de obtener los ADNc correspondientes a dichos genes (*ScMDH1* y *ScMDH2*) en diferentes cultivares de centeno. Uno de los cebadores “*primers*” fue diseñado en una posición próxima al codón de inicio, mientras que el otro “*primer*” se diseñó en una posición próxima al codón de terminación.

La amplificación fue llevada a cabo utilizando como molde los ADNc de tres cultivares tolerantes de centeno (Ailés, Imperial y Petkus) y la línea consanguínea sensible (Riodeva) expuestos a aluminio durante 24 horas. Los productos de PCR con un tamaño similar al esperado fueron clonados y secuenciados siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

Las secuencias de ADNc de ambos genes de centeno *ScMDH1* y *ScMDH2* de 1029 pb y 1023 pb de longitud, respectivamente, fueron comparadas con los ADNc de arroz *Os05g0574400* (*OsMDH1*) y de cebada AK250977.1. La identidad nucleotídica obtenida fue del 87% y 94% para arroz y cebada, respectivamente, en el caso del ADNc de *ScMDH1*. En el caso del ADNc de *ScMDH2*, la comparación con los ADNc de arroz *Os01g0649100* (*OsMDH2*) y de cebada AK252534.1, dio lugar a identidades nucleotídicas del 88% y 97%, respectivamente.

Además, el ADN genómico del cultivar Ailés fue aislado a partir de parejas de “primers” diseñadas en dos exones sucesivos para amplificar cada vez el intrón correspondiente. La posición esperada de los intrones en centeno se definió por comparación con las secuencias genómicas de los genes ortólogos en *Brachypodium distachyon*. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y se determinó el inicio y el final de cada intrón en centeno por comparación con la secuencia del ADNc del gen *ScMDH1* y del gen *ScMDH2* del cultivar de centeno Ailés. Para ambos genes se obtuvo una estructura constituida por 7 exones y 6 intrones (Figura 4.8). El tamaño de los intrones y exones de ambos genes aparece indicado en la Figura 4.8.

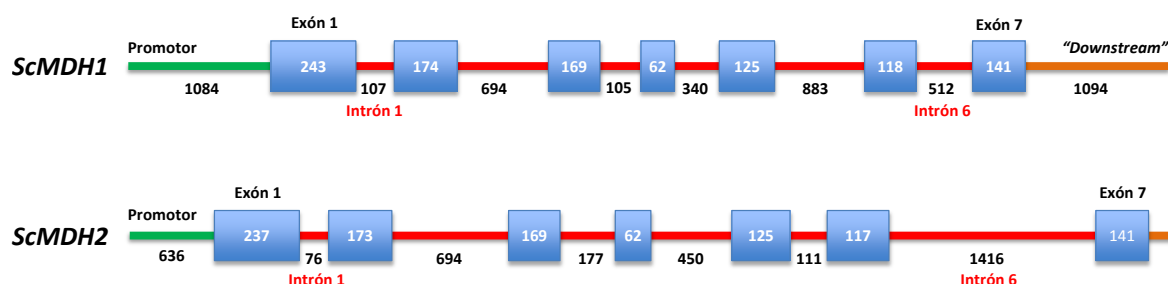


Figura 4.8. Esquema de la estructura de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno. En ambos casos existen siete exones (cajas rectangulares azules) y seis intrones (líneas rojas que unen las cajas rectangulares). En el interior de las cajas se indica en número de pares de bases de cada exón y debajo de las líneas que unen las cajas se indica la longitud en pares de bases de los intrones y de las regiones promotoras y “downstream” obtenidas hasta el momento.

Las regiones que están aguas arriba (“upstream”) y aguas abajo (“downstream”) de ambos genes (*ScMDH1* y *ScMDH2*) se obtuvieron diseñando un cebador en el primer exón de centeno y su pareja a partir de la secuencia “upstream” de *B. distachyon* (región promotora) o bien un cebador en el último exón de centeno y su pareja en la región “downstream” de *B. distachyon*. Las parejas de cebadores empleados se indican en el Apéndice I. El promotor y la región “downstream” del gen *ScMDH1* que conseguimos tenían 1084 pb y 1094 pb, respectivamente. La región promotora de del gen *ScMDH2* que obtuvimos

por este sistema tenía 636 pb en el cultivar Ailés. Sin embargo, no nos fue posible conseguir por este método la región “*downstream*” de este gen en Ailés.

Mediante el uso del programar VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/about.shtml>) fue posible estudiar la identidad entre las secuencias de ADNc de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno con las de ADNc de los genes ortólogos de otras especies de Poáceas (Figura 4.9) y con *Arabidopsis thaliana* como especie fuera de grupo más alejada filogenéticamente de centeno y de las Poáceas. En esta figura, las regiones que presentan una identidad nucleotídica significativa se muestran con segmentos más oscuros. Resulta evidente que el gen más similar a *ScMDH1* de centeno es el de trigo, seguido por el gen correspondiente de cebada. En esta figura se pone de manifiesto la menor identidad del ADNc del gen *ScMDH1* de centeno y del gen equivalente de *Arabidopsis thaliana*. En el caso del ADNc del gen *ScMDH2* el gen más próximo equivalente u ortólogo pertenece a cebada, seguido por el gen correspondiente en bambú. La menor similitud en el caso del ADNc del gen *ScMDH2* corresponde a *Arabidopsis thaliana* y soja. La secuencia de trigo no aparece en la comparación por no disponer de ella.

Las secuencias de ADNc obtenidas para ambos genes de centeno, cómo ya hemos indicado, presentaban una longitud de 1029 pb y 1023 pb para *ScMDH1* y *ScMDH2*, respectivamente. Las proteínas hipotéticas esperadas en cada caso tienen una longitud 342 y 340 aminoácidos, respectivamente, con unos pesos moleculares de 35.689,2 kDa y 35.440,8 kDa y unos puntos isoeléctricos teóricos de 8,78 y 8,24; respectivamente. Las secuencias de dichas hipotéticas proteínas fueron comparadas con las secuencias de aminoácidos de otras enzimas de Malato Deshidrogenasas descritas en diferentes especies de plantas. Estas comparaciones nos han permitido estimar los porcentajes identidad y similitud.

La identidad hace referencia a los residuos idénticos compartidos en las mismas posiciones por las dos secuencias comparadas, mientras que la similitud tiene en cuenta además de las identidades las sustituciones de aminoácidos que muestran propiedades químicas similares (sustituciones sinónimas), que pueden ser fácilmente intercambiadas sin que la estructura de las proteínas se vea afectada significativamente. Por tanto, habitualmente la similitud siempre es mayor que la identidad. Los resultados de estas comparaciones se presentan en la (Figura 4.10.)

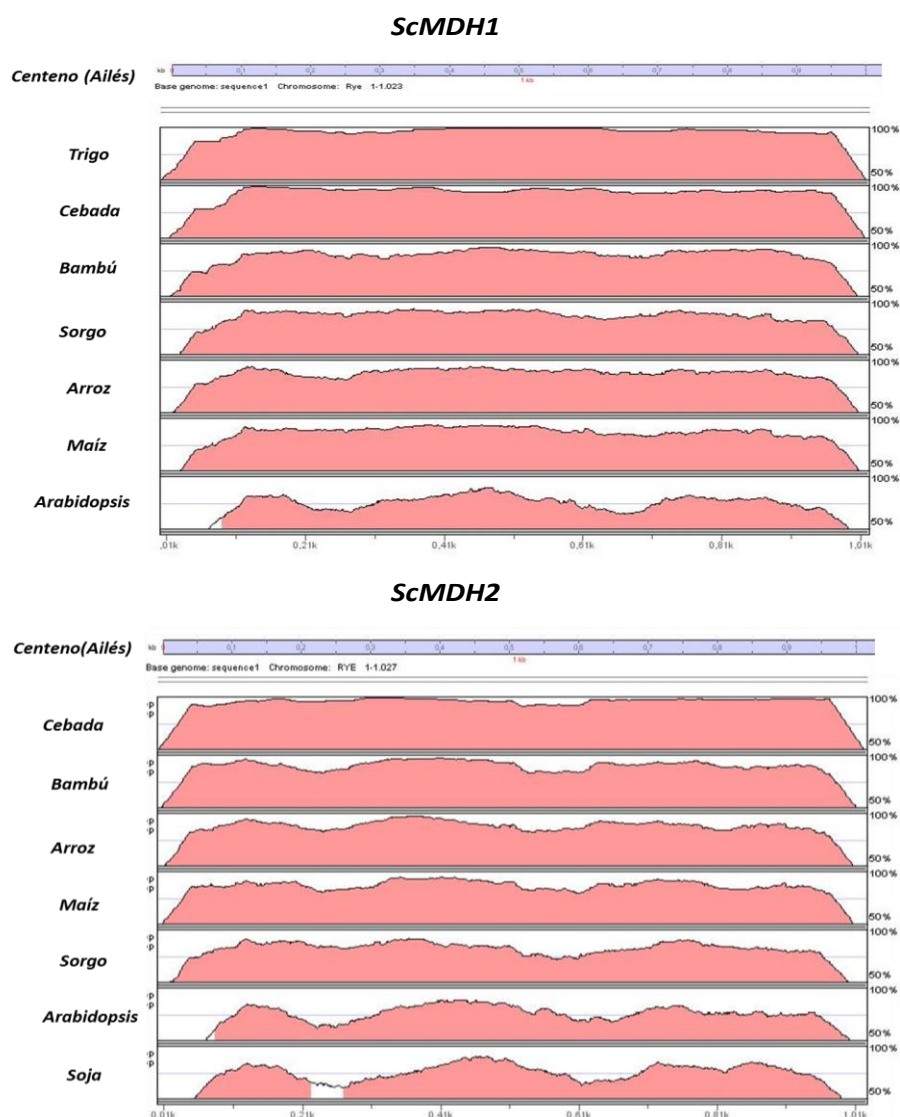


Figura 4.9. Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen *ScMDH1* (parte superior) y del gen *ScMDH2* (parte inferior) del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas y con *Arabidopsis thaliana* y soja. Comparación llevada a cabo con el programa rVISTA. Ordenadas de arriba hacia abajo de mayor identidad a menor identidad.

La proteína *ScMDH1* deducida en centeno mostró unas identidades y similitudes con las proteínas trigo, cebada, bambú, sorgo, maíz, arroz y *Arabidopsis* bastante elevadas. La proteína de trigo fue la más parecida con un 93% de identidad y un 95% de similitud y la menos parecida fue la proteína de *Arabidopsis* con un 42% de identidad y un 54% similitud. Para la proteína *ScMDH2*, los valores de identidad y similitud con la proteína de cebada fueron los mayores (98% y 99%, respectivamente) pero los menores se obtuvieron en la comparación con la proteína de soja (85% y 93% de identidad y similitud, respectivamente).

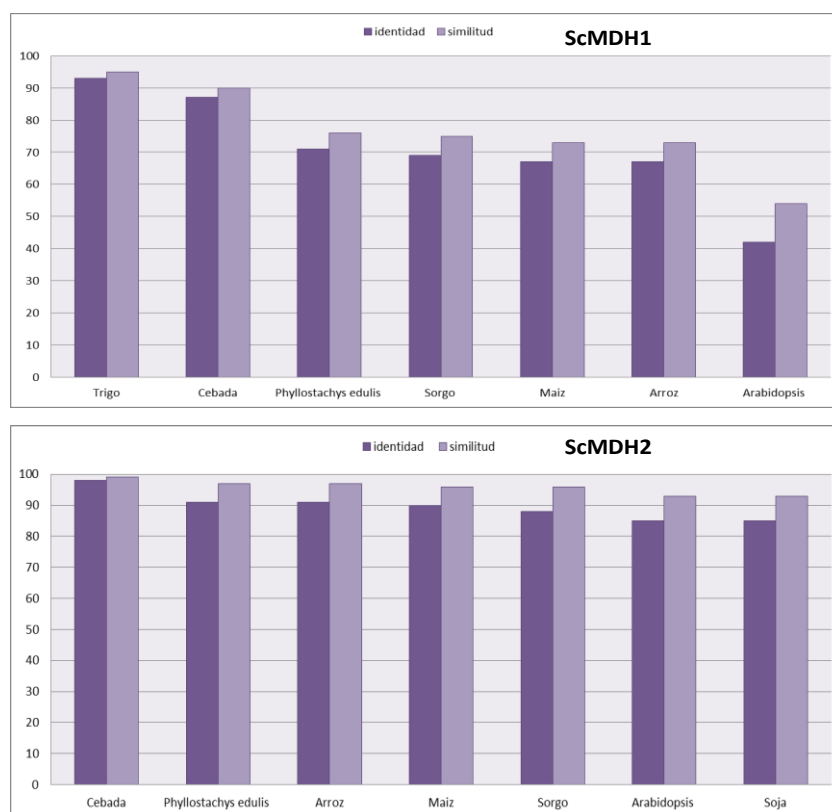


Figura 4.10 Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de las hipotéticas proteínas codificadas por los genes *ScMDH1* (parte superior) y *ScMDH2* (parte inferior) de centeno con las de otras especies de Poáceas y con *Arabidopsis thaliana* y soja. Ordenadas de izquierda a derecha de mayor a menor identidad y similitud.

2.2.1.2. Localización cromosómica de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2*:

Una vez obtenidas las secuencias de ADNc de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* de los tres cultivares tolerantes (Ailés, Petkus e Imperial) y de la línea consanguínea Riodeva y la secuencia de ADN genómico (ADNg) de ambos genes en el cultivar Ailés, nuestro siguiente objetivo fue localizar cromosómicamente ambos genes en centeno. Para ello, se llevaron a cabo amplificaciones empleando parejas de “*primers*” específicas de centeno de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* (Apéndice I) diseñadas a partir de la secuencia de ADNc del cultivar Imperial comparada con las secuencias del gen equivalente en trigo. Las amplificaciones se realizaron utilizando como molde ADNg de las líneas disómicas de adición trigo-centeno (Chinese Spring- Imperial) 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, el trigo parental Chinese Spring, el anfiploide trigo-centeno y el centeno parental Imperial (Figura 4.11). De esta manera conseguimos localizar cromosómicamente el gen de *ScMDH1* en el cromosoma 1R, y el gen *ScMDH2* en el brazo 3RL, ya que los fragmentos amplificados específicos de centeno solamente se obtenían en el parental Imperial (centeno), en el anfiploide trigo-centeno CS-I (que contiene todos los cromosomas de

ambos parentales) y en la línea de adición con el cromosoma 1R (en el caso del gen *ScMDH1*) y en la línea de adición 3R (en el caso del gen *ScMDH2*).

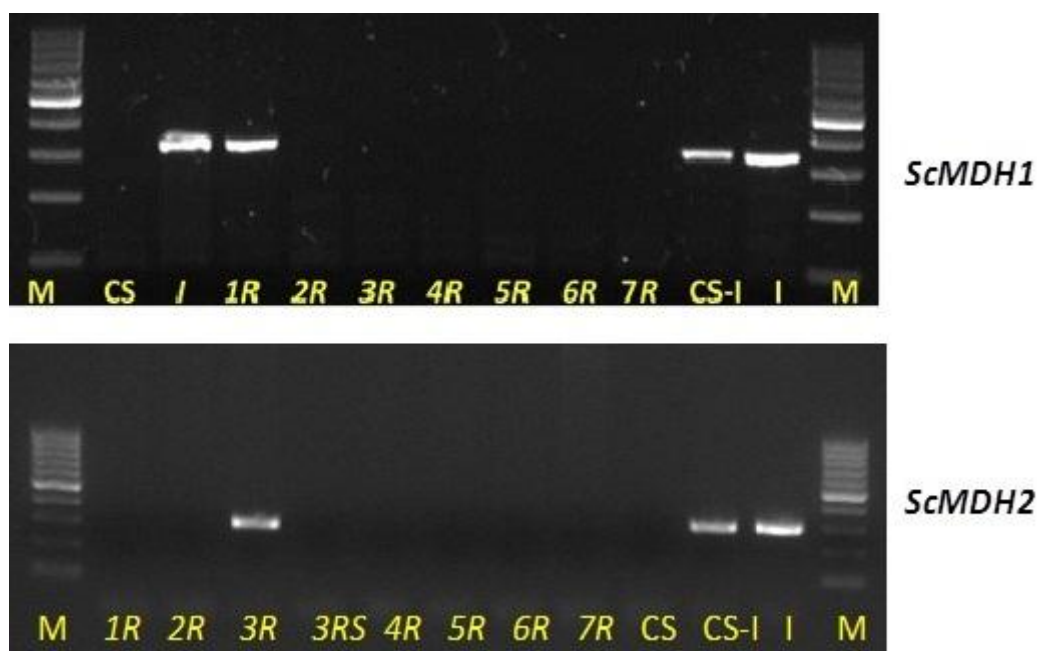


Figura 4.11. Localización cromosómica de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno. Trigo (*Triticum aestivum*) parental Chinese Spring (CS), centeno (*Secale cereale*) parental Imperial (I). Anfiploide trigo-centeno (CS-I), líneas de adición disómicas trigo-centeno (Chinese Spring-Imperial) 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R. M: marcador de peso molecular (100 a 3000 pb).

2.2.1.3. Análisis de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas *ScMDH1* y *ScMDH2* en centeno:-

Para predecir la estructura secundaria a partir de las secuencias de aminoácidos de las hipotéticas proteínas *ScMDH1* y *ScMDH2* empleamos diversos programas informáticos. Todos los programas utilizados indicaron que ambas proteínas presentan una estructura secundaria constituida por 12 regiones hélice α y 12 regiones lámina β . La hipotética estructura secundaria de las proteínas fue obtenida mediante la utilización del programa PSIPRED v3.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Figura 4.12).

Con el fin de crear un modelo tridimensional de las proteínas aisladas (*ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno) esta aplicación funciona mediante el empleo del programa SWISS-MODEL (ver Material y Métodos). Este programa es capaz de construir un modelo tridimensional en base a la identidad de la secuencia de aminoácidos entre la proteína estudiada y otra proteína cuya estructura tridimensional ya ha sido descrita experimentalmente.

Para desarrollar el modelo de la proteína de estudio, el programa lleva a cabo cuatro pasos principales: identificación del patrón, alineamiento de la proteína de estudio con el patrón, construcción del modelo y evaluación del modelo obtenido. *SWISS-MODEL* presenta una biblioteca de patrones obtenidos de la Base de Datos de Proteínas (Protein DataBase, PDB), que realiza una búsqueda de homología de la proteína estudiada, alineándola en una forma similar al patrón.

Si la identidad en la secuencia de aminoácidos entre ambas proteínas supera el 50%, el modelo se genera automáticamente y no es necesario que el usuario lleve a cabo ajustes sobre el modelo obtenido. La evaluación de la fidelidad del modelo obtenido es el paso más importante en la generación de modelos basados en homología. En este sentido, el programa *SWISS-MODEL* dispone de diversas herramientas para valorar numerosos aspectos relacionados con la fiabilidad del modelo: Anolee (Melo y col, 1998), ProQres (Wallner y col, 2005), QMEAN (Benkert y col, 2008), DFire (Zhou y col, 2002), VERIFY3D (Eisenberg y col, 1997), Grom (van Gunsteren y col, 1996), PROCHECK (Laskowsky y col, 2005), PROMOTIF (Hutchinson y col, 1996) y DSSP (Kabsch y col, 1983).

Con el fin de construir un modelo tridimensional para las proteínas *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno, las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas fueron introducidas en el programa *SWISS-MODEL*. Este programa identificó como patrón las proteínas Malato Deshidrogenasa 1 y 2 1smkH de *Citrullus lanatus* (con una resolución de 2.50 Å) descritas por Cox, B. (2005). Los porcentajes de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos entre estas proteínas y las proteínas estudiadas en este trabajo (*ScMDH1* y *ScMDH2*), fueron del 67.4 % y 68.9 % para *ScMDH1* y *ScMDH2*, respectivamente. Como dijimos anteriormente los modelos obtenidos revelaron una estructura basada en 12 hélices α y 12 láminas β para ambas proteínas. El resultado fue evaluado utilizando las herramientas descritas. Obteniendo altos valores de fiabilidad. El modelo proteico para *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno (cultivar Petkus) visto mediante el software Jmol (www.jmol.org) se muestra en la (Figura 4.13.) Todos los programas de predicción de localización subcelular utilizados indican que ambas proteínas, *SCMDH1* y *ScMDH2*, son de localización mitocondrial coincidiendo con lo esperado.

concentraciones. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en medio de cultivo hidropónico a pH ácido ($\text{pH} = 4.0 \pm 0.1$). En los tratamientos a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) la concentración utilizada fue de 300 μM . En los tratamientos a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 300 μM) el tiempo utilizado en todos los casos fue de 12 horas. En los estudios de la expresión en las raíces se empleó como comparación o control las raíces del tratamiento sin Al (tiempo 0 horas) al que se le asignó el valor 1. En el caso de los cambios en las hojas también se comparó con las hojas sin Al a las que se les asignó el valor 1. Como nivel de referencia y comparación se empleó en todas las PCR cuantitativas el ARN ribosómico 18S de las muestras tratadas y de los controles a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de aluminio.

2.2.1.4.1. Cambios en las cantidades del ARN mensajero del gen ScMDH1:-

En primer lugar, analizaremos los cambios en los niveles de mensajeros del gen *ScMDH1* en el cultivar tolerante (*Petkus*). Los resultados están resumidos en la Figura 4.14 A y C. En las **raíces de Petkus** (barras de color azul en la gráfica) se produce una disminución significativa de los niveles del transcrito de *ScMDH1* como consecuencia del tratamiento con Al (Figura 4.14 A y C). A las 4 horas a 300 μM tenemos cuatro veces menos (0,22), a las 8 horas ocho veces menos (0,12), a las 12 horas seis veces (0,17) y a las 24 horas de tratamiento cuatro veces menos (0,22) que en el caso sin Al. De forma semejante, en los tratamientos durante 12 horas de las **raíces de Petkus** a distintas concentraciones (Figura 4.14 C) observamos una disminución de la cantidad de los mensajeros de *ScMDH1*. Disminución de cuatro veces (0,24) a 25 μM , de cinco veces (0,19) a 50 μM , a cuatro veces (0,25) a 100 μM y de seis veces (0,17) a 300 μM . No parece que el aumento en el número de horas de exposición o en la concentración produzca una reducción más significativa de la cantidad de mensajero de *ScMDH1* en las raíces.

Los datos obtenidos a partir de las **hojas** (barras de color rojo en la Figura 4.14 A y C) de **Petkus** muestran que los niveles del mensajero de *ScMDH1* aumentaron significativamente a medida que aumentan las horas de tratamiento con Al a 300 μM . A las 12 horas casi se ha duplicado (1,87) y a las 24 horas hay tres veces y media (3,55) más que en el caso sin Al. Sin embargo, a las 4 horas ha disminuido tres veces (0,34) la cantidad y a las 8 horas tenemos casi lo mismo (0,94) que sin Al. Sin embargo, la cantidad del mensajero de *ScMDH1* en las **hojas** de *Petkus* (tolerante) a 12 horas de

tratamiento y diferentes concentraciones de Al (Figura 4.14 A y C, barras de color rojo) a 25 μ M aumenta dos veces (2,26), a 50 μ M es algo mayor (1,872), a 100 μ M disminuye algo (0,72) y a 300 μ M vuelve a ser casi el doble (1,87). Por tanto, en las hojas de **Petkus** los tratamientos con Al parece que tienden a aumentar la expresión de *ScMDH1* aunque no de una forma intensa (aproximadamente se duplica).

En segundo lugar, en las raíces del cultivar sensible Riodeva (barras de color azul), tal y como se muestra en la Figura 4.14 B y D, la cantidad del mensajero del gen *ScMDH1* también disminuye como consecuencia del tratamiento con Al en el medio hidropónico a una concentración de aluminio de 300 μ M. A las 8 horas ha disminuido a la mitad (0,46), a las 12 horas sigue en la mitad (0,48) y a las 24 horas ha disminuido tres veces (0,33) con respecto al caso sin Al. Además, la cantidad relativa del mensajero del gen *ScMDH1* en las raíces del cultivar sensible (Riodeva) a 12 horas de tratamiento pero con diferentes concentraciones de aluminio sigue la misma tendencia. La cantidad se reduce alrededor de la mitad (0,46) a 50 μ M y (0,48) a 100 μ M con respecto al caso sin Al.

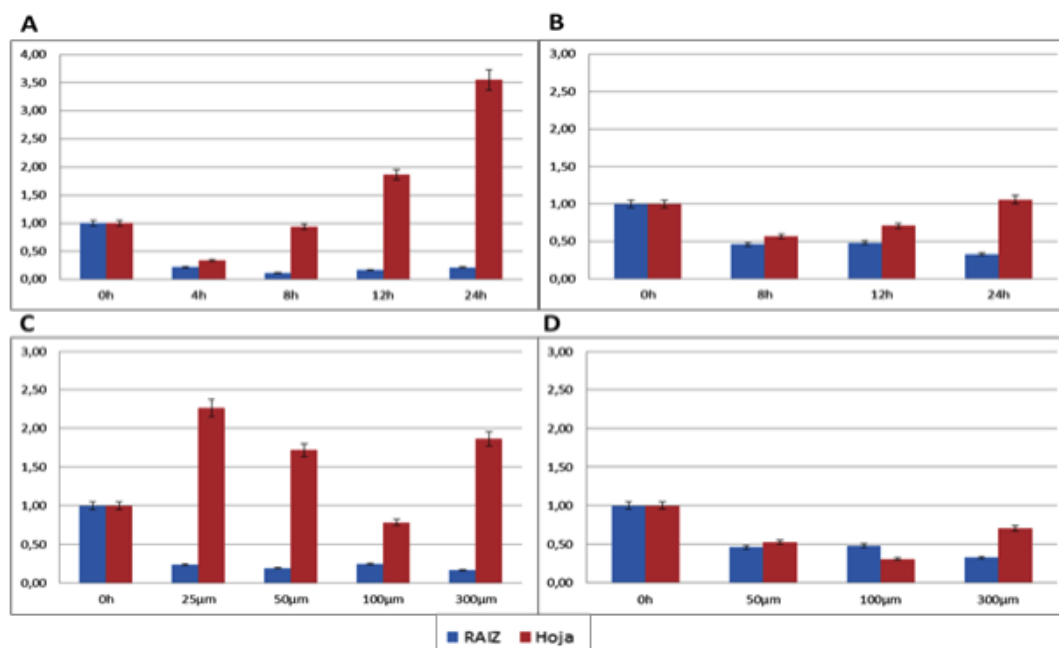


Figura 4.14. Cantidad relativa el mensajero del gen *ScMDH1* en raíces (barras de color azul) y hojas (barras de color rojo) del cultivar tolerante Petkus (A y C, mitad izquierda) y de la línea consanguínea sensible Riodeva (B y D, mitad derecha) a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) con una concentración de 300 μ M y a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 300 μ M) a 12 horas de tratamiento.

En el caso de la **hojas** (barras de color rojo) a una concentración de 300 μ M, se observó que la cantidad relativa del mensajero del gen *ScMDH1* se reduce casi a la mitad (0,57) tras 8 horas y sigue siendo menor (0,71) que en el caso

sin Al a las 0 ó 12 horas, alcanzando finalmente, a las 24 horas, el mismo nivel (1,06) que las muestras que no fueron expuestas a aluminio.

Además, como se muestra en la Figura 4.14 D, la transcripción del gen *ScMDH1* a las 12 horas en las **hojas** del cultivar **Riodeva** disminuyó tras el tratamiento de las plantas con diferentes concentraciones de aluminio. Cae a la mitad (0,53) a 50 μM , disminuye tres veces (0,31) a 100 μM y a 300 μM sigue siendo algo inferior (0,71) que en el caso sin Al.

2.2.1.4.2 Cambios en las cantidades del ARN mensajero del gen *ScMDH2*:-

Por otro lado, en el caso del ARN mensajero del gen *ScMDH2*, tal y como se muestra en la Figura 4.15 A, las cantidades relativas del ARN en las **raíces** (barras de color azul) del cultivar tolerante **Petkus** disminuyen significativamente con respecto al caso sin Al tras 4 horas (0,27; cuatro veces), 8 horas (0,13; ocho veces), 12 horas (0,18; seis veces) y 24 horas (0,28; alrededor de cuatro veces) de exposición a aluminio a una concentración de 300 μM . En el caso de la exposición a diferentes concentraciones de aluminio durante 12 horas, las cantidades del ARN mensajero del gen *ScMDH2* en las **raíces** (barras azules) de **Petkus** también bajan de forma significativa (Figura 4.15 C) con respecto al caso sin Al. A la concentración de 25 μM (0,26) se reduce cuatro veces, a 50 μM (0,25) disminuye también cuatro veces, a 100 μM (0,33) baja tres veces y, por último a 300 μM (0,18) disminuye seis veces.

En el caso de las **hojas** (barras de color rojo) de **Petkus**, la cantidad del ARNm del gen *ScMDH2* aumentó gradualmente a 300 μM de Al tras 4 horas (0,63), 8 horas (1,37), 12 horas (1,68) para llegar a ser significativo a las 24 horas (2,59, dos veces y media (Figura 4.15 A). Cuando las plantas de **Petkus** fueron tratadas a diferentes concentraciones de aluminio a 12 horas, no se observaron cambios significativos importantes en las cantidades relativas del ARNm del gen *ScMDH2* (Figura 4.15 C). Por tanto, parece que se produce un inducción moderada (aumento al doble) en las hojas del cultivar tolerante (**Petkus**) a las 24 horas y 300 μM de Al.

En el caso de la expresión de *ScMDH2* en las **raíces** (barras de color azul) del cultivar sensible **Riodeva** (Figura 4.15 B), se detectaron cambios significativos en la cantidad de ARNm a distintos tiempos y 300 μM con respecto al caso sin Al. Los resultados indican una moderada represión (disminución en la cantidad de ARNm) tras 8 horas (0,39; disminución de dos veces y media), 12

horas (0,31; disminución de tres veces) and 24 horas (0,30; disminución de tres veces). Además, a diferentes concentraciones de aluminio durante 12 horas de exposición, se observó la misma tendencia en la expresión de *ScMDH2* en **raíces** (barras de color azul) del cultivar sensible **Riodeva**, se produce una disminución en las cantidades de ARNm del gen *ScMDH2* con valores de 0.26 (descenso de cuatro veces) y 0.17 (descenso de seis veces), para concentraciones de 50 μM y 100 μM , respectivamente (Figura 4.15 D).

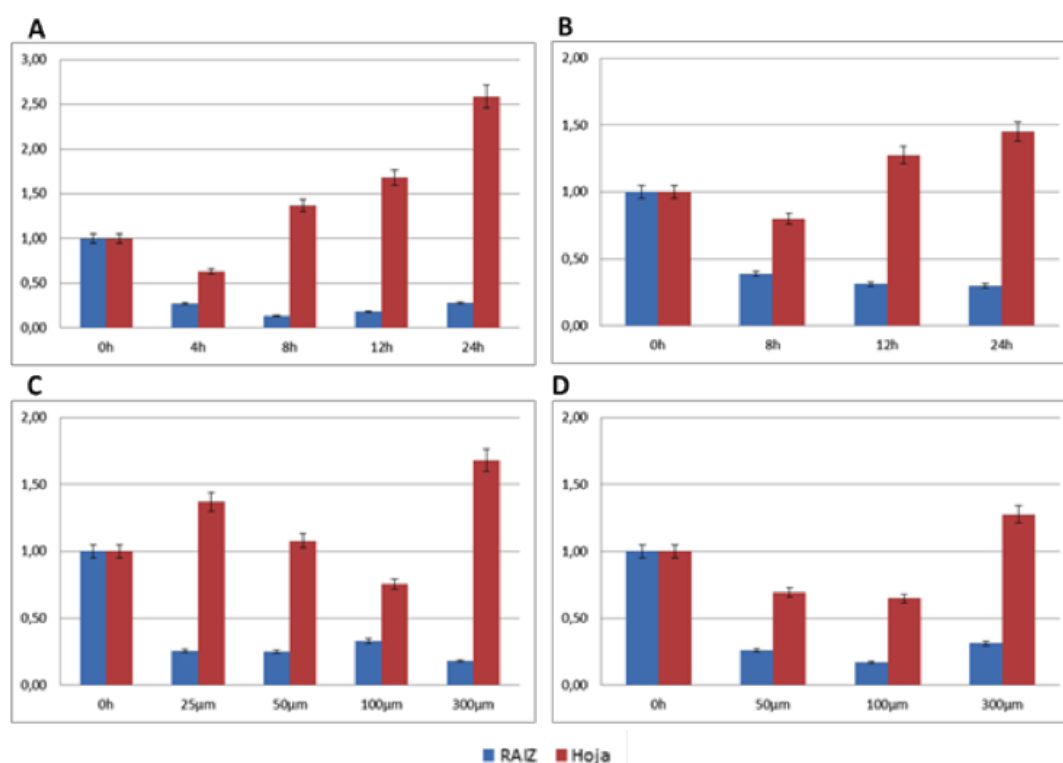


Figura 4.15. Cantidad relativa el mensajero del gen *ScMDH2* en raíces (barras de color azul) y hojas (barras de color rojo) del cultivar tolerante Petkus (A y C, mitad izquierda) y de la línea consanguínea sensible Riodeva (B y D, mitad derecha) a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) con una concentración de 300 μM y a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 300 μM) a 12 horas de tratamiento.

Al estudiar las cantidades de ARNm del gen *ScMDH2* en las **hojas** (barras de color rojo) de **Riodeva** (sensible) no se observaron cambios significativos (en ningún caso llega a duplicarse) a los diferentes tiempos y 300 μM con respecto al caso sin Al (Figura 4.15 B). [8 horas (0.80), 12 horas (1.28), y 24 horas (1.45)]. La tendencia para las cantidades de ARNm del gen *ScMDH2* en las **hojas** (barras de color rojo) del cultivar **Riodeva** a diferentes concentraciones de aluminio a 12 horas se muestra en la Figura 4.15 D. Como puede observarse, sigue un comportamiento similar al del el cultivar tolerante Petkus, es decir, no se producen cambios significativos en la expresión, obteniéndose valores de 1.72 y 0.78 a las concentraciones 50 μM y 100 μM , respectivamente.

En conclusión, en las **raíces**, la transcripción de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno, tanto en el cultivar tolerante (Petkus) como en la línea sensible (Riodeva), disminuyó tras 24 horas de exposición al aluminio a una concentración de 300 μM siendo el grado de disminución (represión) mayor en el cultivar tolerante que en el sensible. Además, se observó la misma tendencia en las **raíces** para ambos genes en los dos tipos de cultivares tras la exposición a diferentes concentraciones de aluminio (25 μM , 50 μM , 100 μM) durante 12 horas. Cabe destacar que el cultivar Petkus presentó una mayor disminución en la transcripción de estos genes que el cultivar Riodeva, salvo en el caso del ARNm del gen *ScMDH2* a una concentración de 100 μM .

Al comparar el nivel de transcripción entre ambos genes, comprobamos que el grado de disminución es superior en el caso de *ScMDH2* para el cultivar Riodeva, mientras que en el cultivar Petkus el grado de disminución es superior en *ScMDH1*.

Por otro lado, en las **hojas**, la transcripción de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* en el cultivar tolerante (**Petkus**) parece aumentar después de 24 horas de exposición a aluminio a una concentración de 300 μM . Este grado de aumento en el cultivar tolerante es mayor para *ScMDH1* que para *ScMDH2*. En el caso del cultivar sensible, no se detectan cambios significativos en las hojas para ambos genes. Además, en referencia a la exposición a diferentes concentraciones de aluminio (25 μM , 50 μM , 100 μM) durante 12 horas en las **hojas**, se observó que el ARNm de *ScMDH1* parece aumentar ligeramente mientras que el ARNm de *ScMDH2* no parece cambiar. En las hojas de Riodeva la expresión de *ScMDH1* parece disminuir, mientras que la de *ScMDH2* no varía. Otras comparaciones importantes son la cantidad relativa de mensajeros en raíces y en hojas, ya que nos permiten saber en cual de los dos tejidos se expresa más intensamente el ARNm estudiado. Además, también son muy importantes las comparaciones de las cantidades relativas de ARNm entre el cultivar tolerante (Petkus) y la línea sensible (Riodeva), ya que nos indican si el cultivar tolerante posee antes de estar en contacto con el Al una mayor o menor cantidad de los ARNm estudiados y si después del tratamiento con Al se mantienen esas diferencias. Estas comparaciones las llevaremos a cabo para todos los ARNm de los genes estudiados al mismo tiempo más adelante.

2.2.1.5. Relaciones filogenéticas detectadas comparando las secuencias de nucleótidos de los ADNc y de las proteínas codificadas por ScMDH1 y ScMDH2 con las de otras especies de Poáceas:-

Para confirmar que los genes de *ScMDH1* y *ScMDH2* de centeno aislados son los ortólogos de los genes de malato deshidrogenasa mitocondrial de arroz y cebada (que fueron empleados para el diseño de los “primers” utilizados para amplificar en centeno), estudiamos las relaciones filogenéticas entre estos genes y otros genes de Poáceas que se encuentran disponibles en las bases de datos del NCBI. Una vez que identificamos y caracterizamos *ScMDH1* y *ScMDH2*, llevamos a cabo la búsqueda de secuencias homólogas a la Malato Deshidrogenasa mitocondrial de otras especies de Poáceas mediante la aplicación GenBank BLAST. Analizamos las relaciones filogenéticas entre los ADNc y las secuencias aminoacídicas de ambos genes de centeno y los ADNc y las secuencias aminoacídicas de otras Poáceas (cebada, arroz, trigo, maíz, sorgo y bambú) empleando el programa MEGA 5.05 (Tamura y col 2007).

En todos los casos, se emplearon tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y once modelos distintos de análisis para las secuencias de nucleótidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Maximum Composite Likelihood*, *Jukes-Cantor*, *Tajima Nei*, *Kimura 2-parameter*, *Tamura 3-parameter*, *General Time Reversible*, *Tamura Nei* y *Hasegawa-Kishino-Yano*). En el caso de las secuencias de nucleótidos de los ADNc se obtuvieron un total de 33 (3 x 11) dendrogramas para cada gen. De igual forma, para la comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas hipotéticas codificadas por ambos genes, se utilizaron tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y nueve modelos distintos de análisis de las secuencias de aminoácidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Equal input*, *Dayhoff*, *Jones-Taylor-Thornton (JTT)*, *Dayhoff model with Freqs. (+F)*, *WAG model*, *WAG with Freqs. (+F)*). Por tanto, en las comparaciones de proteínas se obtuvieron un total de 27 (3 x 9) dendrogramas para cada uno de los genes estudiados. En todos los casos se utilizó el programa “Mega 5.05” (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura y col2011) para obtener todos los dendrogramas. El valor de “*Bootstrap*” empleado en todos los casos fue 10.000.

En todos los casos, los diferentes dendrogramas obtenidos para el mismo gen con distintos métodos de agrupamiento y con diferentes estimadores de los cambios nucleotídicos o, en su caso, de los cambios de aminoácidos, tenían la misma estructura. Es decir, siempre mostraban los mismos agrupamientos

(“cluster”) y subagrupamientos (“subcluster”). Además, los valores de “bootstrap” obtenidos en todos los casos fueron bastante elevados, indicando que los dendrogramas obtenidos y los “clusters” y “subclusters” observados son bastante consistentes. En la (Figura 4.16) están los dendrogramas obtenidos con los ADNc y proteínas de ambos genes.

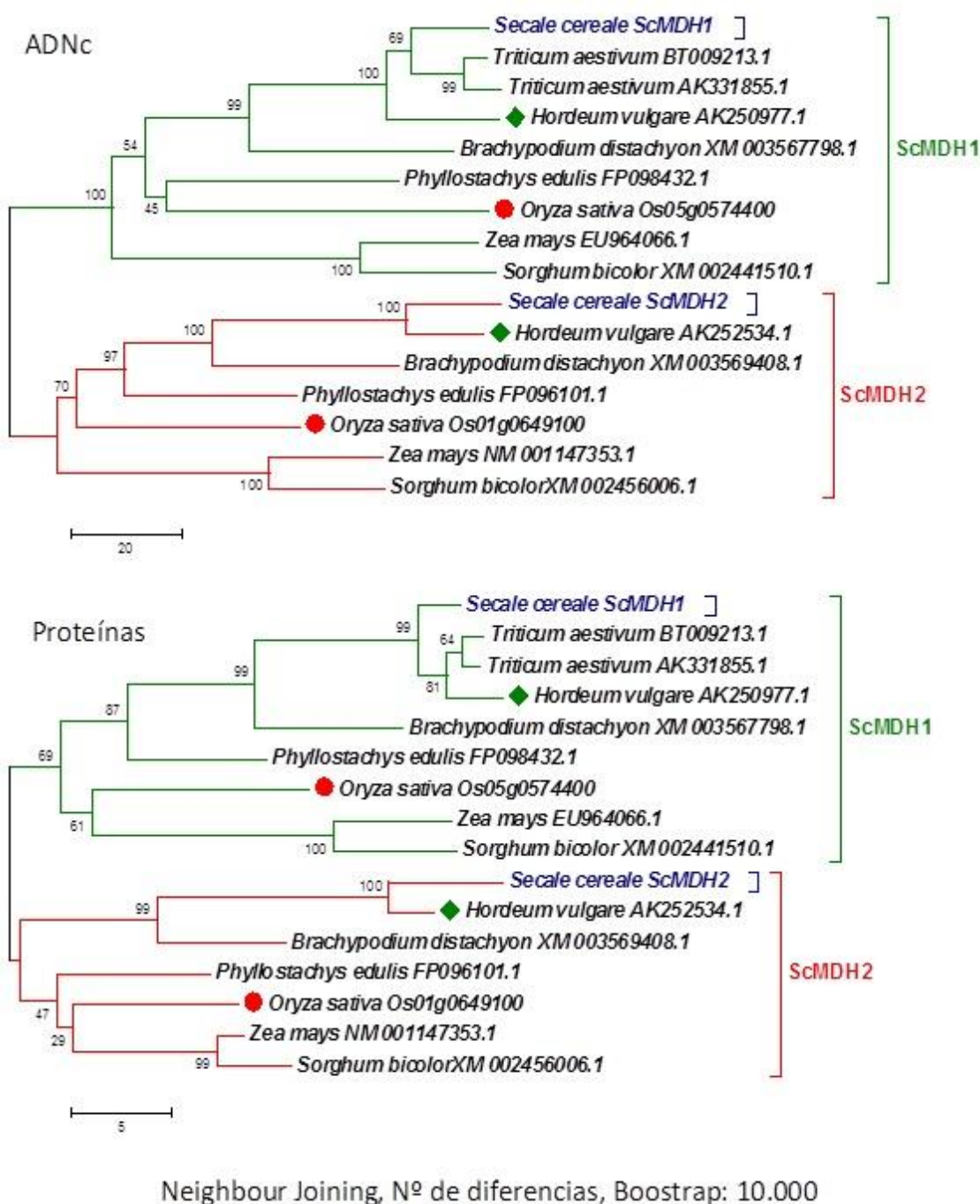


Figura 4.16: Parte superior: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) de los genes ScMDH1 y ScMDH2 en diversas especies de Poáceas. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y estimador de cambios nucleotídicos empleado fue el N° de diferencias (*N° of differences*). “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Parte inferior: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de las proteínas hipotéticas de los genes ScMDH1 y ScMDH2 en diversas especies de Poáceas. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios de aminoácidos empleado fue el N° de diferencias (*N° of differences*). “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Las líneas de color verde señalan el agrupamiento del ScMDH1 y las de color rojo el de ScMDH2. Los círculos de color rojo indican la secuencia de arroz de partida y los rombos de color verde la secuencia de cebada. Con texto en color azul se señalan las secuencias obtenidas en esta tesis.

En la (Figura 4.16) se representan los dendrogramas obtenidos con las secuencias de los ADNc de ambos genes (Parte superior) y con las secuencias de aminoácidos de las proteínas (Parte inferior). En ambos árboles se observa la misma estructura de “clusters” y “subclusters”. Aparece un agrupamiento para el gen *ScMDH1* o en su caso la proteína y otro agrupamiento para el gen *ScMDH2* o para su proteína. Las secuencias de centeno se agrupan en el mismo subgrupo o “subcluster” con las de otras Triticíneas, como trigo y cebada. En otro “subcluster” se encuentran maíz y sorgo.

La filogenia obtenida para ambos genes *ScMDH1* y *ScMDH2* es congruente: las secuencias más cercanas a la de centeno son las de trigo y cebada. *Brachypodium distachyon* (especie modelo) está más próximo a trigo, centeno y cebada que arroz. Las siguientes especies más próximas a trigo, centeno y cebada son bambú y arroz y, por último, maíz y sorgo están más alejados. El dendrograma obtenido apoya que los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* aislados en centeno son ortólogos de los genes *MDH* correspondientes de arroz y cebada empleados para diseñar los cebadores y obtener sus equivalentes en centeno.

El gen *ScMDH1* es ortólogo del gen *OsMDH1* de arroz (situado en el cromosoma 5) y el gen *ScMDH2* es ortólogo del gen *OsMDH2* de arroz (localizado en el cromosoma 1). Además, ambos genes (*ScMDH1* y *ScMDH2*) son parálogos en centeno y proceden de un gen ancestral que se duplicó antes de la aparición de la familia de las Poáceas. Además, como veremos la localización del gen *ScMDH1* en el cromosoma 1R de centeno coincide con lo esperado por las relaciones de sintenia entre los cromosomas de centeno, trigo y arroz.

2.2.1.6. Diversidad molecular en centeno y en Poáceas:-

También hemos obtenido las secuencias de los ADNc de ambos genes *ScMDH1* y *ScMDH2* en tres cultivares de centeno tolerantes (“Ailés”, “Imperial” y “Petkus”) y en la línea consanguínea sensible (“Riodeva”). Con estas secuencias hemos estimado varios parámetros de variabilidad en *Secale cereale* con el programa DnaSP v5 (Tablas 4.5 y 4.6). Además, hemos analizado la variabilidad de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* comparando varias especies de Poáceas (Tabla 4.7).

De los dos genes analizados en centeno, el gen *ScMDH1* es bastante más variable que el *ScMDH2*. El número de sitios variables polimórficos (SNPs) y la diversidad nucleotídica (π) en *ScMDH1* fueron 21 y 0,00933 y para *ScMDH2* 3

y 0,00147, respectivamente. El ADNc del gen *ScMDH1* se detectó variabilidad en seis de los siete exones (el exón 4 no presentó SNPs), mientras que en el ADNc del gen *ScMDH2* solamente se observó variación en el exón 7 (Tablas 4.5 y 4.6). El número de cambios sinónimos fue mayor que el de cambios no sinónimos para ambos genes.

Tabla 4.5. Variabilidad detectada entre diferentes genotipos o cultivares de centeno (tres cultivares y una línea consanguínea) en los ADNc del gen *ScMDH1*. Analizada por exones y para el ADNc completo. Del cultivar Ailés se han analizado dos secuencias.

<i>ScMDH1</i>	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	ADNc
Nº total de secuencias (cultivares)	5	5	5	5	5	5	5	5
Nº total de posiciones o sitios	243	174	169	62	125	118	138	1029
Indels (Inserciones/deleciones)	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	236	170	167	63	122	114	137	1008
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	7	4	2	0	3	4	1	21
Sitio variable (<i>singleton</i>)	6	2	2	0	1	4	0	15
Sitios variables parsimónicos	1	2	0	0	2	0	1	6
Número de haplotipos, h	5	4	3	0	3	3	2	5
Diversidad haplotípica	1	0,9	0,7	0	0,8	0,7	0,6	1
Diversidad nucleotídica, π	0,01235	0,01149	0,00473	0	0,01280	0,01356	0,00435	0,00933
Nº total cambios sinónimos	4	3	1	0	2	3	1	14
Nº total cambios no sinónimos	3	1	1	0	1	1	0	7

Tabla 4.6. Variabilidad detectada entre diferentes genotipos o cultivares de centeno (tres cultivares y una línea consanguínea) en los ADNc del gen *ScMDH2*. Analizada por exones y para el ADNc completo.

<i>ScMDH2</i>	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	ADNc
Nº total de secuencias (cultivares)	4	4	4	4	4	4	4	4
Nº total de posiciones o sitios	237	173	169	62	125	117	138	1023
Indels (Inserciones/deleciones)	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	237	173	169	63	125	117	138	1020
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	0	0	0	0	0	0	3	3
Sitio variable (<i>singleton</i>)	0	0	0	0	0	0	0	3
Sitios variables parsimónicos	0	0	0	0	0	0	3	0
Número de haplotipos, h	0	0	0	0	0	0	4	4
Diversidad haplotípica	0	0	0	0	0	0	1	1
Diversidad nucleotídica, π	0	0	0	0	0	0	0,01064	0,00147
Nº total cambios sinónimos	0	0	0	0	0	0	2	2
Nº total cambios no sinónimos	0	0	0	0	0	0	1	1

También analizamos la variabilidad en diferentes especies de Poáceas para los ADNc de ambos genes. En este caso, se observa una ligera mayor variación para el ADNc de *ScMDH2* (312 SNPs y 0,11932 de diversidad nucleotídica) que para el ADNc de *ScMDH1* (291 SNPs y 0,11653 de diversidad nucleotídica). El

número de cambios sinónimos es mayor en ambos genes que el de cambios no sinónimos. Siendo además ambos parámetros mayores para *ScMDH2* que para *ScMDH1* (Tabla 4.7). En cualquier caso, la variabilidad observada cuando se comparan distintas especies de Poáceas es muy superior a la detectada en la comparación de muestras de centeno. Además hay que tener en cuenta que solamente hemos analizado cuatro muestras de centeno y que las especies de Poáceas estudiadas han sido entre 7 y 9 según el gen analizado.

Tabla 4.7. Variabilidad detectada en los ADNc completos de los genes *ScMDH1* y *ScMDH2* entre diferentes especies de Poáceas (incluida centeno). Parámetros de diversidad genética estimados con el programa DnaSP v5.

Poáceas	<i>ScMDH1</i>	<i>ScMDH2</i>
Nº total de secuencias	7	9
Nº total de posiciones o sitios	1029	1044
Indels (Inserciones/deleciones)	3	1
Sitios invariables (monomórficos)	729	703
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	291	312
Sitio variable (<i>singleton</i>)	178	150
Sitios variables parsimónicos	113	162
Número de haplotipos, h	7	9
Diversidad haplotípica	1	1
Diversidad nucleotídica, π	0,11653	0,11932
Conservación secuencia	0,716	0,691
Nº total cambios sinónimos	230	248
Nº total cambios no sinónimos	56	60

2.2.2 Identificación y caracterización de la Citrato Sintasa (CS) mitocondrial de centeno:-

2.2.2.1. Identificación y secuenciación del gen ScCS:-

En *Arabidopsis* y arroz, se han identificado dos genes que codifican para la Citrato Sintasa mitocondrial: el gen *AtCS* (citrato sintasa 4, *At2g44350* de *Arabidopsis*, que es homólogo del gen *Os11g0538900* de arroz) y el gen *CSY5* (citrato sintasa 5, *At3g60100* de *Arabidopsis*, que es homólogo del gen *Os02g0194100* de arroz). Llevamos a cabo una búsqueda de secuencias homólogas de estos genes mediante la aplicación GenBank BLAST con el objeto de determinar si ha sido identificada previamente una secuencia génica homóloga a las secuencias de algunas especies pertenecientes a la tribu Triticeae. Aunque no se ha descrito ninguna secuencia homóloga a la del gen

OsCSY5 de arroz en esta tribu, se encontró en la base de datos del NCBI una secuencia de cebada [FLbaf5f16 clon (AK248736)] que mostraba un alto grado de identidad y similitud con la del gen OsCSY5 de arroz.

Para aislar el ADNc correspondiente a este gen de citrato sintasa (OsCSY5) en centeno, se diseñó una pareja de “*primers*” en regiones altamente conservadas de las secuencias del gen en arroz (OsCSY5) y el clon de cebada (FLbaf5f16, AK248736). Uno de los “*primers*” fue diseñado en una posición próxima al codón de iniciación y el otro, próximo al codón de terminación a fin de conseguir la amplificación del ADNc completo (de la región codificante). La amplificación fue llevada a cabo a partir de ADNc obtenidos después de la exposición de las raíces a 24 horas de tratamiento con Al. Se utilizaron tres cultivares tolerantes de centeno (Ailés, Imperial y Petkus) y la línea consanguínea sensible Riodeva. Los productos de PCR con un tamaño similar al esperado fueron clonados y secuenciados siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos Asimismo, el ADN genómico (ADNg) del cultivar Ailés fue aislado a partir del diseño de parejas de “*primers*” específicas para cada intrón. Estas parejas de “*primers*” fueron diseñadas comparando la secuencia del ADNc del gen de citrato sintasa en centeno (ScCS) con el ADNg (genómico) del gen de citrato sintasa equivalente (*BdCS*) en *Brachypodium distachyon*.

Los resultados obtenidos indicaron que el gen ScCS de centeno está formado por 19 exones y 18 intrones (Figura 4.17). Además, todos los programas de predicción de localización subcelular utilizados indicaron que se trataba de una proteína mitocondrial. La región codificante del gen ScCS 1416 pb de longitud en las cuatro muestras de centeno analizadas (los tres cultivares “Ailés”, “Imperial” y “Petkus”, y la línea “Riodeva”).

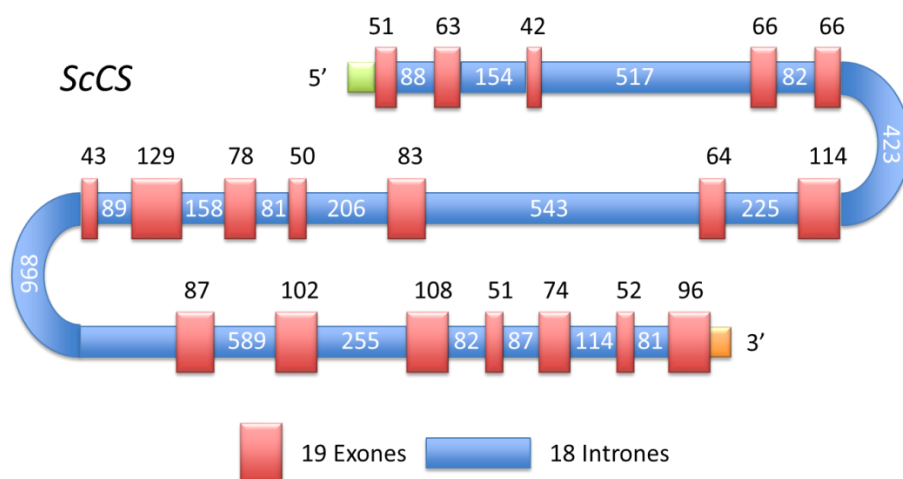


Figura 4.17. Esquema del gen ScCS del cultivar de centeno Ailés. Las cajas de color rojo son los 19 exones y los rectángulos de color azul los 18 intrones. Los números de color negro situados sobre los exones indican el tamaño de cada exón en pares de bases. Los números blancos en el interior de los intrones indican el tamaño en pares de bases de cada intrón.

La secuencia del gen ScCS de centeno se comparó con la secuencia del clon AK248736 de cebada y con la secuencia de los genes de arroz OsCSY5 (Os02g0194100, citrato sintasa 5) y OsCSY4 (Os11g0538900, citrato sintasa 4) encontrándose valores de identidad muy elevados (Figura 4.18). Igualmente también se comparó la secuencia de la hipotética proteína de centeno con las de las proteínas de estos tres genes (AK248736, OsCSY5 y OsCSY4) obteniendo las siguientes identidades y similitudes del 96.79 y 97.13%, 88.01 y 88.22%, y 87.94 y 88.15%, respectivamente (Figura 4.19). También comparamos las secuencias de los ADNc de las cuatro muestras de centeno estudiadas (cuatro alelos) encontrado una identidad del 99.62%.

Mediante el uso del programa rVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/about.shtml>) comparamos las identidades entre la secuencia del ADNc del gen ScCS de centeno del cultivar Ailés y las secuencias de ADNc de genes equivalentes en seis especies de Poáceas (trigo, cebada, *B. distachyon*, arroz, maíz y sorgo) (Figura 4.18). En esta Figura (4.18), las regiones que presentan una homología nucleotídica significativa se muestran como segmentos más oscuros y resulta evidente que el gen más parecido o con mayor identidad al gen ScCS de centeno es el de trigo, seguido del gen de cebada. Igualmente, se puede observar una menor identidad del gen ScCS con los genes más semejantes de sorgo y maíz.

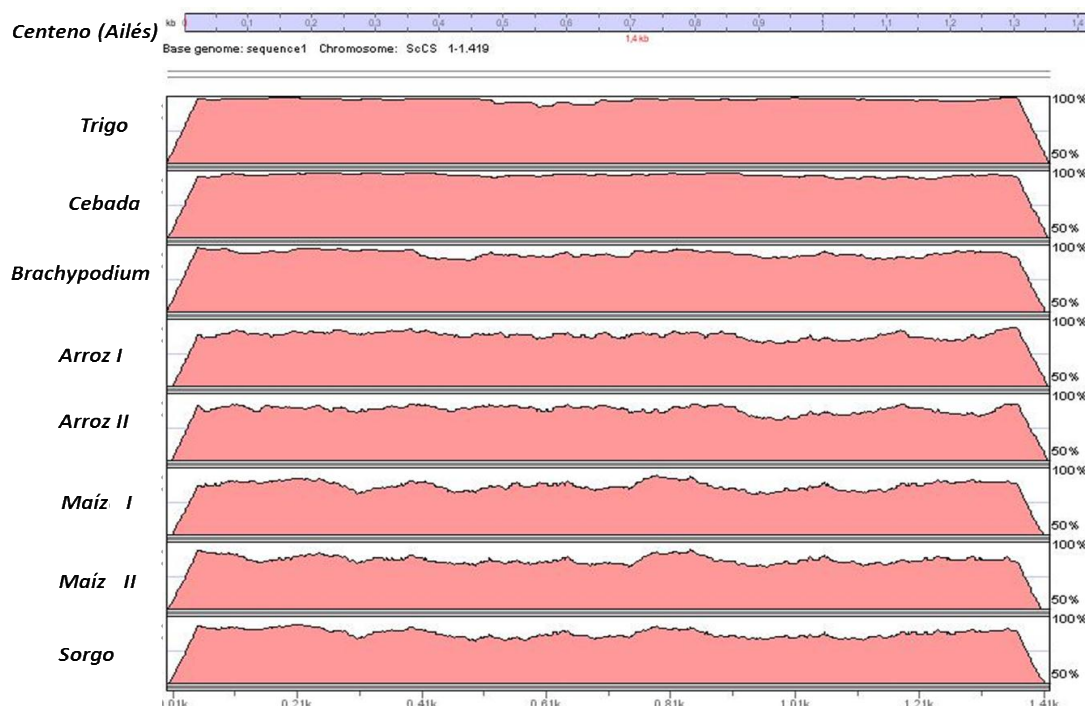


Figura 4.18. Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen ScCS del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas. Las secuencias indicadas como arroz I y II son la de los genes *OsCSY5* y *OsCSY4*, respectivamente. Las secuencias de maíz indicadas como maíz I y maíz II, son *ZmCSY5* y *ZmCSY4*, respectivamente. Comparación llevada a cabo con el programa rVISTA. Ordenadas de arriba hacia abajo de mayor identidad a menor identidad.

Las cuatro secuencias de ADNc obtenidas (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) presentaban una región codificante de 1419 pb. La proteína hipotética codificada contiene 472 aminoácidos, tiene un peso molecular estimado que oscila entre los 52,56 y 52,62 kDa, un punto isoeléctrico teórico que varía entre 6,65 y 6,88 y un dominio proteico característico de la citrato sintasa (Citrato_synt, pfam00285). Las secuencias de dichas proteínas hipotéticas de centeno fueron comparadas con las secuencias de otras citrato sintasas mitocondriales descritas en diferentes especies vegetales. Esta comparación se llevó a cabo con los porcentajes de identidad y similitud suministrados por la base de datos del NCBI cuando se lleva a cabo una búsqueda y alineamiento mediante la opción BLAST. Los resultados de dichas comparaciones se muestran en la (Figura 4.19.) Se han escogido para la comparación las secuencias de cebada (AK248736) y de arroz (*OsCSY5*) utilizadas para diseñar los “primers” y otra de arroz de citrato sintasa y dos de *Arabidopsis thaliana*. Los porcentajes de identidad y similitud en la secuencia de aminoácidos entre la proteína hipotética de centeno y las secuencias AK248736 de cebada, *OsCSY5* y *OsCS* de arroz fueron: 99.58 a 99.79%, 94.07 a 94.49% y 93.43 a 93.86%, respectivamente, tal y como se muestra en la (Figura 4.19.) Como era de esperar la semejanza con las proteínas de citrato sintasa de *Arabidopsis* fue inferior, aunque también muy elevada (valores superiores al 75%).

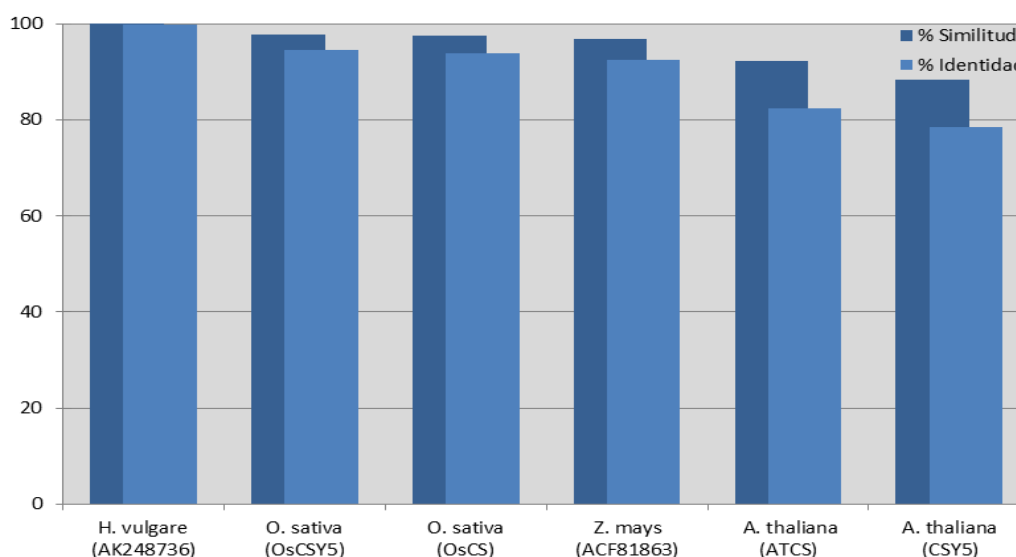


Figura 4.19 Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de la hipotética proteína codificada por el gen *ScCS* de centeno y las secuencias de las proteínas otras especies de Poáceas y de *Arabidopsis thaliana*. Ordenadas de izquierda a derecha de mayor a menor identidad y similitud.

2.2.2.2. Localización cromosómica del gen *ScCS*:-

Con la finalidad de localizar el gen *ScCS*, llevamos a cabo amplificaciones empleando parejas específicas de “*primers*” de centeno (Apéndice I) con el ADN genómico de las líneas disómicas de adición y ditelosómicas trigo-centeno Chinese Spring (CS) – Imperial (I). El producto de amplificación específico de centeno fue detectado en el centeno Imperial, en el anfiploide CS-I que tiene todos los cromosomas de trigo y centeno, y en la línea de adición 6R. En la línea de adición ditelosómica 6RS, al igual que en el resto de líneas de adición disómicas, no se observó el fragmento específico de centeno (Figura 4.20). Por tanto, el gen *ScCS* de centeno se encontraría en el brazo 6RL.

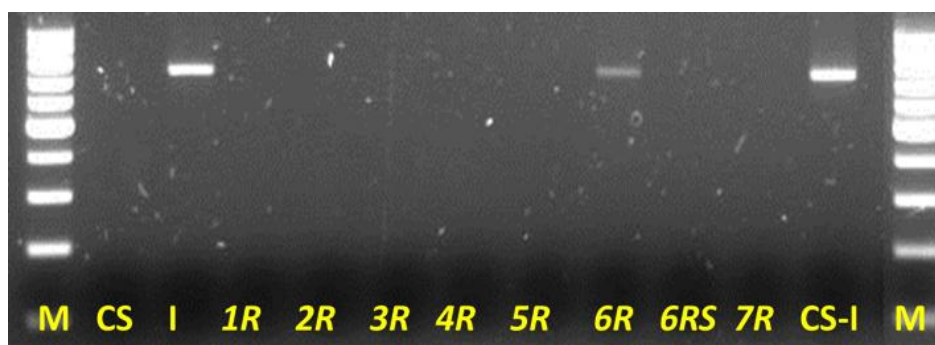


Figura 4.20. Localización cromosómica del gen *ScCS* de centeno. Trigo (*Triticum aestivum*) parental Chinese Spring (CS), centeno (*Secale cereale*) parental Imperial (I). Anfiploide trigo-centeno (CS-I), líneas de adición disómicas trigo-centeno (Chinese Spring-Imperial) 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R. Línea ditelosómica de adición 6RS y Anfiploide CS-I. M: marcador de peso molecular (100 a 3000 pb).

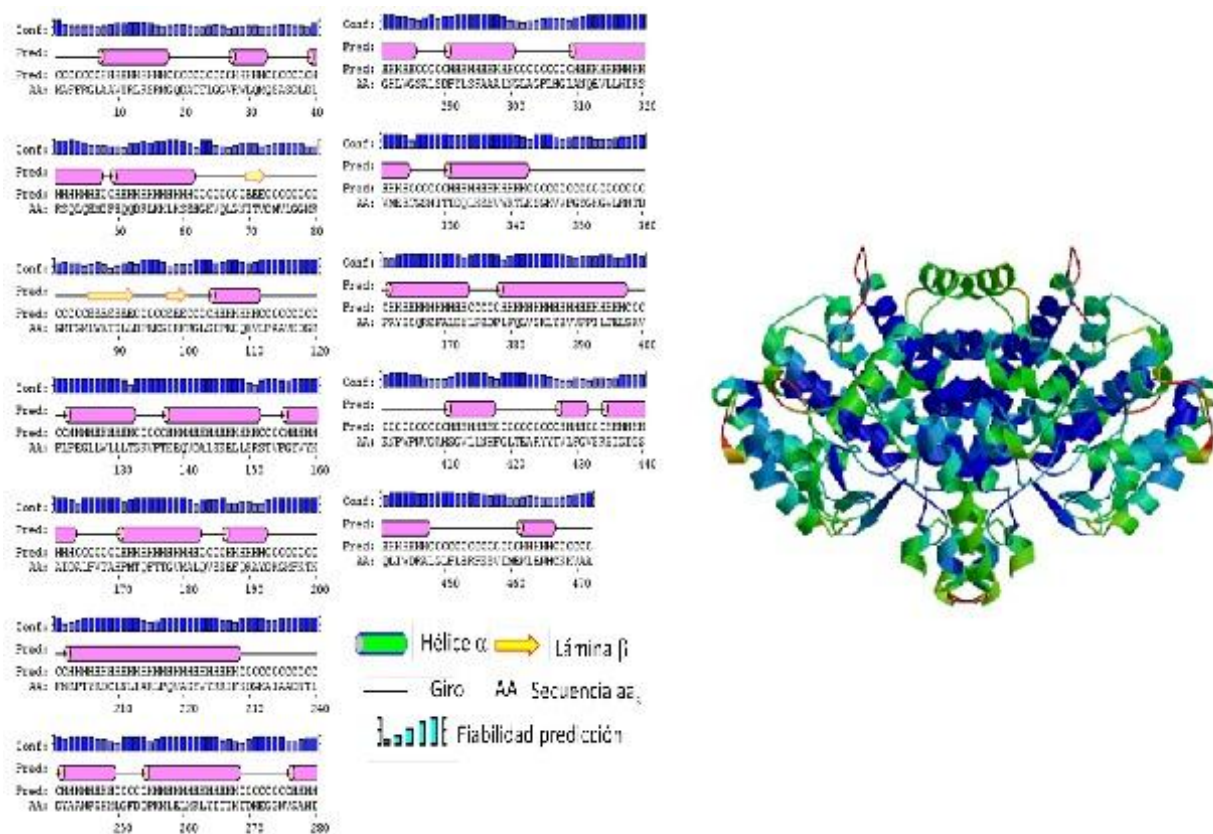
2.2.2.3. Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína ScCS en centeno:-

Las estructuras secundarias de las proteínas hipotéticas de centeno fueron obtenidas utilizando el servidor para la predicción de estructuras proteicas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). El dominio CS (citrato sintasa) presenta 23 regiones en α -hélice y 3 regiones en lámina β (Figura 4.21). La comparación de las cuatro proteínas hipotéticas de centeno obtenidas (cuatro alelos) en este estudio dio lugar a la detección únicamente de 4 sustituciones de aminoácidos. Al compararlas con las secuencias de cebada (AK248736) y arroz (OsCSY5 y OsCS) encontramos 5, 30 y 33 sustituciones de aminoácidos, respectivamente. El programa PSIPRED (ver Material y Métodos) predijo básicamente la misma estructura secundaria para todas las proteínas analizadas y no detectó ningún cambio significativo en la estructura secundaria de estas proteínas.

Para crear un modelo tridimensional de la proteína hipotética de centeno ScCS se utilizó el programa *SWISS-MODEL* (ver Material y Métodos). Este programa identificó como patrón para todas las secuencias de citrato sintasa mitocondrial de centeno una citrato sintasa de *Gallus gallus* (con una resolución de 2.00 Å) descrita por Remington y col (1982). En todos los casos el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos fue del 60%. Todos los modelos obtenidos tenían 23 dominios α -hélice y 3 regiones en lámina β y fueron evaluados empleando las herramientas mencionadas previamente en este trabajo, obteniendo altos valores de confianza. El modelo proteico generado para la proteína ScCS de centeno (cultivar Petkus) visto mediante el software Jmol (www.jmol.org) se muestra en la (Figura 4.21.)

2.2.2.4. Análisis de la expresión del gen ScCS:-

Hemos estudiado los cambios en la expresión de los mensajeros del gen ScCS mediante PCR cuantitativa en tiempo real en raíces y en hojas del cultivar Petkus (tolerante) y de la línea consanguínea Riodeva (sensible,) a diferentes tiempos de tratamiento con Al y a distintas concentraciones. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en medio de cultivo hidropónico a pH ácido (pH = 4.0 ± 0.1).



Hipotética estructura secundaria

Hipotética estructura terciaria

Figura 4.21. A la izquierda la hipotética estructura secundaria obtenida con el PSIPRED v3.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para la hipotética proteína ScCS de centeno. La estructura secundaria está constituida por 23 regiones α hélice y 3 regiones lámina β . A la derecha la hipotética estructura terciaria de ScCS del cultivar Petkus. Estructura terciaria obtenida con el programa SWISS-MODEL. La proteína de la base de datos del Protein DataBase (PDB) que presentó mayor similitud con las nuestras (60 %) fue de *Gallus gallus* (con una resolución de 2.00 Å).

En los tratamientos a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) la concentración utilizada fue de 300 μ M. En los tratamientos a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 300 μ M) el tiempo utilizado en todos los casos fue de 12 horas. En los estudios de la expresión en las raíces se empleó como comparación o control las raíces del tratamiento sin Al (tiempo 0 horas) al que se le asignó el valor 1. En el caso de los cambios en las hojas también se comparó con las hojas sin Al a las que se les asignó el valor 1. Como nivel de referencia y comparación se empleó en todas las PCR cuantitativas el ARN ribosómico 18S de las muestras tratadas y de los controles a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de aluminio.

Los niveles de ARNm de ScCS en las muestras de **raíces** (barras de color azul) en el **cultivar tolerante (Petkus)** disminuyeron aproximadamente a un tercio tras 4 horas (0.35) de tratamiento. Tras 8 horas (0.19, disminución de 5

veces), 12 horas (0,22, disminución aproximada de cuatro veces) y 24 horas (0,27, disminución de cuatro veces) de tratamiento con Al siguieron siendo inferiores con respecto al caso sin Al (Figura 4.22 A). Cuando se analizaron los niveles de ARNm de ScCS tras el tratamiento del cultivar tolerante (Petkus) a diferentes concentraciones de aluminio (25 μ M, 50 μ M, y 100 μ M) durante 12 horas, se detectaron los siguientes valores 0,24; 0,39 y 0,40; respectivamente (Figura 4.22 C). Es decir, también se produjo una disminución o represión de la expresión del ARNm que a 300 μ M fue de aproximadamente cuatro veces (0,22) con respecto al caso son Al.

Por el contrario, en el caso de las **hojas** (barras de color rojo) del **cultivar tolerante**, no se detectaron cambios significativos en la expresión del ARNm a distintas horas ni a distintas concentraciones de Al.

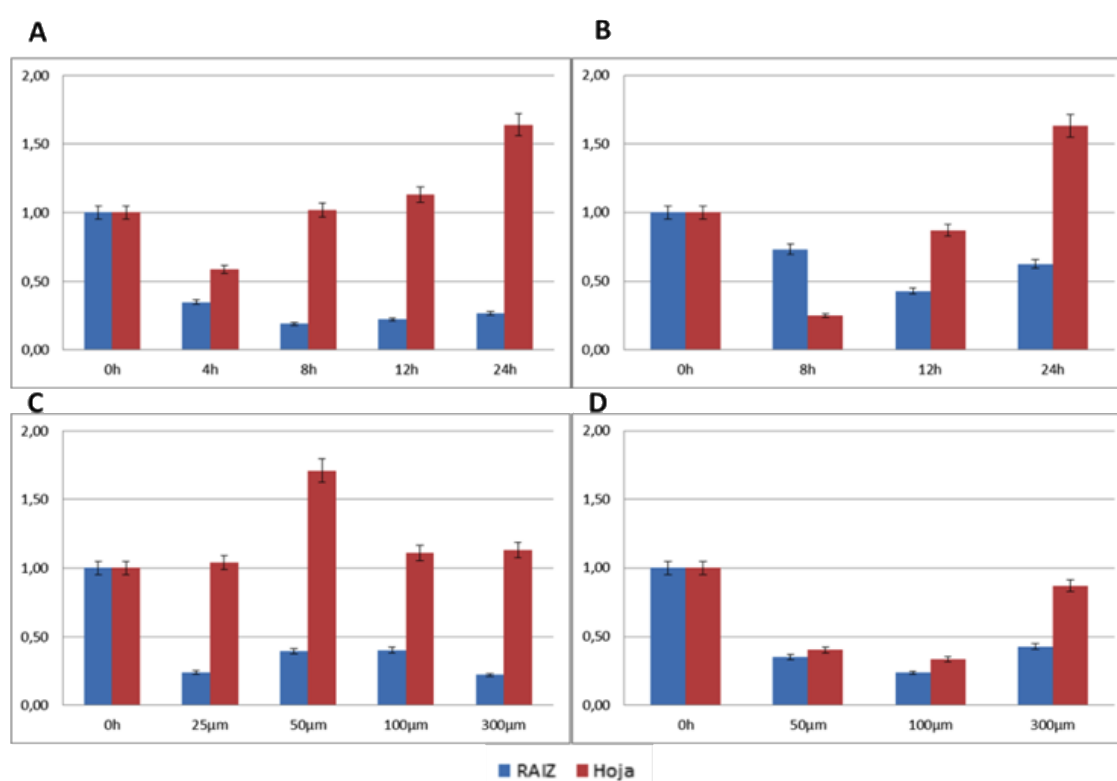


Figura 4.22. Cantidad relativa el mensajero del gen ScCS en raíces (barras de color azul) y hojas (barras de color rojo) del cultivar tolerante Petkus (A y C, mitad izquierda) y de la línea consanguínea sensible Riodeva (B y D, mitad derecha) a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) con una concentración de 300 μ M y a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 300 μ M) a 12 horas de tratamiento.

En ningún caso, la expresión llegó a duplicarse con respecto a la situación sin Al aunque en algunos momentos o concentraciones aumentó ligeramente. Los niveles del ARNm de ScCS fueron los siguientes tras 4 horas (0,59), 8 horas (1,02), 12 horas (1,13) y finalmente 24 horas (1.64) (Figuras 4.22 A). Los valores en las **hojas** (barras de color rojo) del cultivar tolerante, tras a 12 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de aluminio (25 μ M, 50

μM , y 100 μM) fueron de 1.04 y 1.71 para 25 μM y 50 μM , respectivamente, mientras que fue (1,11) para 100 μM (Figura 4.22 C).

En el caso de las **raíces** (barras de color azul) del **cultivar sensible (Riodeva)** los cantidades de ARNm de ScCS detectados a 8, 12 y 24 horas fueron 0,73; 0,43 y 0,62; respectivamente, con respecto al caso sin Al. Se produce una disminución, pero no llega a reducirse a la mitad después de 24 horas (Figura 4.22 B). Además, en el tratamiento con diferentes concentraciones de aluminio a 12 horas, la expresión del gen ScCS también disminuyó, observándose valores de 0,35 y 0,24 (disminución de cuatro veces) a las concentraciones de 50 μM y 100 μM , respectivamente (Figura 4.22 D). En este caso si que se producen caídas significativas o reducciones a más de la mitad. En el caso de las **hojas** (barras de color azul) del **cultivar sensible**, se detectó una disminución significativa en los niveles de ARNm tras 8 horas (0,25) de tratamiento (Figura 4.22 B). Pero tras 12 horas (0,87) y 24 horas (1,63) se produjo una recuperación. Además, en el tratamiento con diferentes concentraciones de aluminio a 12 horas, la expresión del gen en las **hojas** (barras de color rojo) de Riodeva disminuyó a las concentraciones de 50 μM y 100 μM , obteniéndose valores de 0,40 y 0,34; respectivamente (Figura 4.22 D). Pero a 300 μM se recuperó.

En conclusión, los niveles del ARNm del gen ScCS en las raíces del cultivar tolerante disminuyen de forma significativa mientras que en las raíces de la línea sensible no cambian de forma significativa. En las hojas del cultivar tolerante y de la línea sensible no se producen cambios significativos excepto a de 50 μM y 100 μM en la línea sensible Riodeva.

2.2.2.5. Relaciones filogenéticas entre miembros del citrato sintasa mitocondrial de cereales:-

Para confirmar que el gen de centeno aislado es el ortólogo de los genes de citrato sintasa mitocondrial de arroz y cebada (que fueron empleados para el diseño de los “*primers*” utilizados para amplificar en centeno), estudiamos las relaciones filogenéticas entre este gen y otros genes de Poáceas que se encuentran disponibles en las bases de datos del NCBI. Una vez que identificamos y caracterizamos ScCS, llevamos a cabo la búsqueda de secuencias homólogas a la Citrato Sintasa mitocondrial de otras especies de Poáceas mediante la aplicación GenBank BLAST. Analizamos las relaciones filogenéticas entre los ANDc y las secuencias aminoacídicas de ambos genes

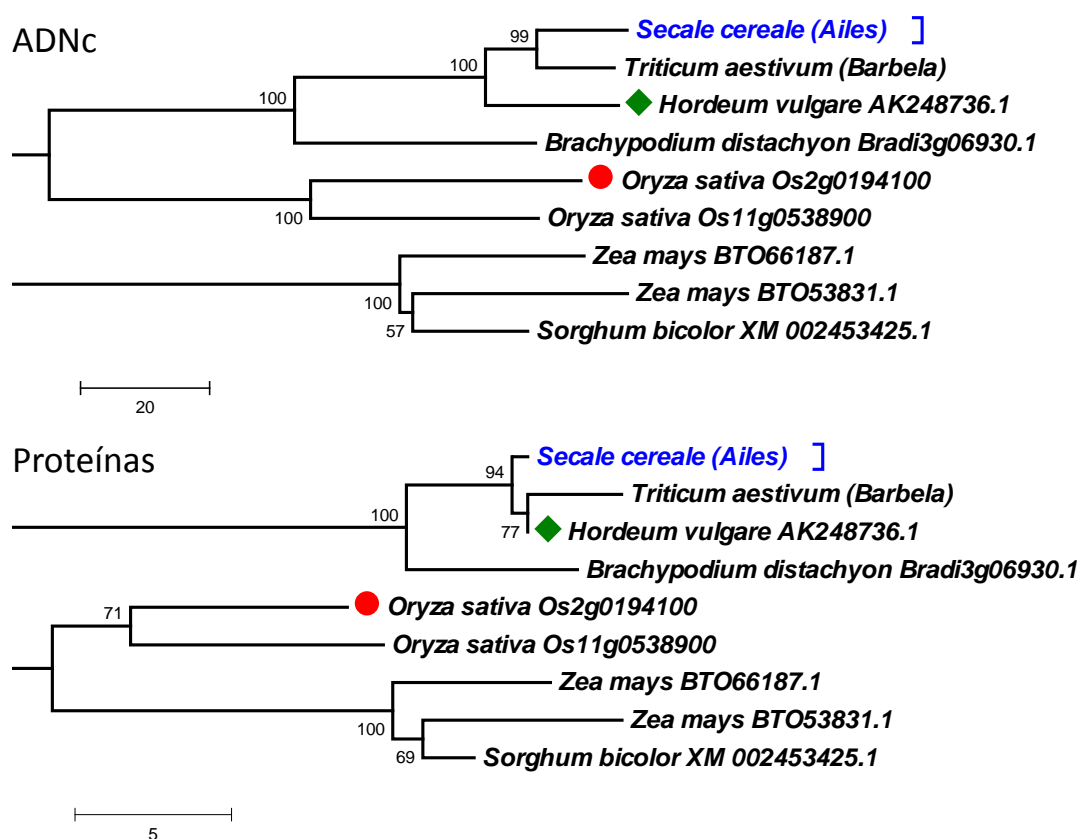
de centeno y los ADNc y las secuencias aminoacídicas de otras Poáceas (cebada, arroz, trigo, *B. distachyon*, maíz y sorgo) empleando el programa MEGA 5.05 (Tamura y col 2007).

En todos los casos, se emplearon tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y once modelos distintos de análisis para las secuencias de nucleótidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Maximum Composite Likelihood*, *Jukes-Cantor*, *Tajima Nei*, *Kimura 2-parameter*, *Tamura 3-parameter*, *General Time Reversible*, *Tamura Nei* y *Hasegawa-Kishino-Yano*). En el caso de las secuencias de nucleótidos de los ADNc se obtuvieron un total de 33 (3 x 11) dendrogramas. De igual forma, para la comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética codificada por ScCS, se utilizaron tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y nueve modelos distintos de análisis de las secuencias de aminoácidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Equal input*, *Dayhoff*, *Jones-Taylor-Thornton (JTT)*, *Dayhoff model with Freqs. (+F)*, *WAG model*, *WAG with Freqs. (+F)*). Por tanto, en las comparaciones de proteínas se obtuvieron un total de 27 (3 x 9) dendrogramas. En todos los casos se utilizó el programa “Mega 5.05” (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura y col 2011) para obtener todos los dendrogramas. El valor de “*Bootstrap*” empleado en todos los casos fue 10.000.

En todos los casos, los diferentes dendrogramas obtenidos con distintos métodos de agrupamiento y con diferentes estimadores de los cambios nucleotídicos o, en su caso, de los cambios de aminoácidos, tenían la misma estructura. Es decir, siempre mostraban los mismos agrupamientos (“*cluster*”) y subagrupamientos (“*subcluster*”). Además, los valores de “*bootstrap*” obtenidos en todos los casos fueron bastante elevados, indicando que los dendrogramas obtenidos y los “*clusters*” y “*subclusters*” observados son bastante consistentes.

En la (Figura 4.23) se representan los dendrogramas obtenidos con las secuencias de los ADNc de ambos genes (Parte superior) y con las secuencias de aminoácidos de las proteínas (Parte inferior). En ambos árboles se observa una estructura muy semejante aunque no idéntica de “*clusters*” y “*subclusters*”. Las secuencias de centeno se agrupan en el mismo subgrupo o “*subcluster*” con las de otras Triticíneas, como trigo y cebada. En otro “*subcluster*” se encuentran maíz y sorgo.

La filogenia obtenida para este gen ScCS es congruente con las relaciones conocidas entre estas especies: las secuencias más cercanas a la de centeno son las de trigo y cebada. *Brachypodium distachyon* (especie modelo) está más próximo a trigo, centeno y cebada que arroz, estando en el mismo “cluster” que ellas. La siguiente especie más próxima a trigo, centeno y cebada es arroz y, por último, maíz y sorgo están más alejados. El dendrograma obtenido apoya que el gen ScCS aislado en centeno es ortólogo de los genes CS correspondientes de arroz y cebada empleados para diseñar los cebadores y obtener sus equivalentes en centeno.



Neighbour Joining, N° de diferencias, Bootstrap: 10.000

Figura 4.23: Parte superior: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) del gen ScCS en diversas especies de Poáceas. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios nucleotídicos empleado fue el N° de diferencias (*N° of differences*). “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Parte inferior: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética del gen ScCS en diversas especies de Poáceas. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios de aminoácidos empleado fue el N° de diferencias (*N° of differences*). “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Los círculos de color rojo indican la secuencia de arroz de partida y los rombos de color verde la secuencia de cebada. Con texto de color azul claro se ha indicado la secuencia de citrato sintasa obtenida en esta tesis.

El gen ScCS es ortólogo del gen OsCSY5 de arroz (situado en el cromosoma 5) y el gen ScMDH2 es ortólogo de los genes OsCSY5 y OsCS de arroz (localizados en los cromosomas 2 y 11). Además, como veremos la localización del gen

ScCS en el brazo cromosómico 6RL de centeno coincide con lo esperado por las relaciones de sintenia entre los cromosomas de centeno, trigo, *B. distachyon* y arroz.

2.2.2.6. Diversidad Molecular en Centeno y Poáceas:-

Hemos analizado la variabilidad en los ADNc del gen ScCS de centeno empleando ocho secuencias distintas (clones diferentes), una de Ailés, cuatro del cultivar Imperial, dos de Petkus y otra de Riodeva. En dicho estudio hemos analizado la variabilidad detectada en cada uno de los 19 exones del gen y en el ADNc completo (Tabla 4.8). También, hemos llevado a cabo un análisis de la diversidad en cada uno de los 19 exones y en el ADNc completo comparando las secuencias de 7 especies de Poáceas (9 secuencias, las mismas que las incluidas en el dendrograma de la Figura 4.23), incluida centeno (Tabla 4.9). En la Tabla 4.10 hemos comparado la variación detectada en las 8 secuencias de *Secale cereale* (centenos) con la encontrada entre las 7 especies de Poáceas analizadas (9 secuencias). Todos los parámetros indicados en las Tablas se obtuvieron con el programa DnaSP v5.

Como era de esperar la variabilidad entre las secuencias de centeno (Tabla 4.8 y Tabla 4.10) fue menor que la observada entre las secuencias de distintas especies de Poáceas (Tabla 4.9 y 4.10). En el caso de las secuencias de centeno solamente los exones 4, 5, 11, 14, 15, 17 y 19 mostraron SNPs (Tabla 4.8). El exón más variable fue el 17. El número total de SNPs fue de 12 y la diversidad nucleotídica de 0,00269 (Tabla 4.9). En las comparaciones entre Poáceas, el número total de SNP fue 329 y la diversidad nucleotídica 0,10097. Además, todos los exones fueron variables (Tabla 4.9). El exón con mayor promedio de SNPs por cada 100 nucleótidos fue el 9 (30 SNPs/100).

Tabla 4.8. Variabilidad detectada entre diferentes genotipos o cultivares de centeno (tres cultivares y una línea consanguínea) y 8 secuencias (una de Ailes, cuatro de Imperial, dos de Petkus y otra de Riodeva) en los ADNc del gen ScCS. Analizada por exones y para el ADNc completo.

Centenos (8 secuencias)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	ADNc
Nº total de secuencias	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Nº total de posiciones o sitios	51	63	42	66	66	114	64	83	50	78	129	43	87	102	108	51	74	52	96	1419
Indels (Inserciones/deleciones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	51	63	42	65	65	114	64	83	50	78	127	43	87	100	106	51	72	52	94	1407
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	2	0	2	12
Sitio variable (<i>singleton</i>)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	2	0	1	10
Sitios variables parsimónicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Nº total cambios sinónimos	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	4
Nº total cambios no sinónimos	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	3	9

En lo que respecta a los cambios sufridos en las proteínas hipotéticas codificadas por el gen ScCS, el número de cambios sinónimos fue mayor que el de no sinónimos en la comparación entre especies de Poáceas. Sin embargo, la situación se invirtió en el caso de las secuencias de centeno, donde el número de cambios no sinónimos fue superior al de sinónimos (Tabla 4.10). Igualmente, el grado de conservación entre las secuencias de centeno (0,992) fue bastante superior al grado de conservación entre las secuencias de Poáceas (0,768) como es de esperar para diferentes especies. En el ADNc del gen ScCS, tanto en las comparaciones entre secuencias de centeno, como en las comparaciones entre secuencias de Poáceas, no se detectaron inserciones ni deleciones (Indels).

Tabla 4.9. Variabilidad detectada entre siete especies de Poáceas, incluida centeno (un total de 9 secuencias, las mismas que las incluidas en el dendrograma de la Figura 4. 23). Analizada por exones y para el ADNc completo de ScCS.

Poáceas (9 secuencias)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	ADNc
Nº total de secuencias	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Nº total de posiciones o sitios	51	63	42	66	66	114	64	83	50	78	129	43	87	102	108	51	74	52	96	1419
Indels (Inserciones/deleciones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	38	51	35	49	53	91	50	60	35	60	92	38	68	73	83	40	60	38	76	1090
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	13	12	7	17	13	23	14	23	15	18	37	5	19	29	25	11	14	14	20	329
SNPs/100	25	19	17	26	20	20	22	28	30	23	29	12	22	28	23	21	19	27	21	23
Sitio variable (<i>singleton</i>)	8	4	2	10	6	8	2	8	5	10	15	1	2	8	3	5	3	3	4	107
Sitios variables parsimónicos	5	8	5	7	7	15	12	15	10	8	22	4	17	21	22	6	11	11	16	222
Nº total cambios sinónimos	9	8	6	16	12	24	8	18	13	16	28	6	21	25	27	11	19	16	17	300
Nº total cambios no sinónimos	3	2	3	0	2	2	4	4	6	4	6	0	0	5	5	0	1	1	3	51

Tabla 4.10. Variabilidad detectada en los ADNc completos del genes ScCS entre diferentes cultivares de centeno y entre distintas especies de Poáceas (incluida centeno). Parámetros de diversidad genética estimados con el programa DnaSP v5.

ScCS	Centenos	Poáceas
Nº total de secuencias	8	9
Nº total de posiciones o sitios	1419	1419
Indels (Inserciones/deleciones)	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	1407	1090
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	12	329
Sitio variable (<i>singleton</i>)	10	107
Sitios variables parsimónicos	2	222
Número de haplotipos, h	8	9
Diversidad haplotípica	1	1
Diversidad nucleotídica, π	0,00269	0,10097
Conservación secuencia	0,992	0,768
Nº total cambios sinónimos	4	300
Nº total cambios no sinónimos	9	51

2.2.3. Identificación y Caracterización de la Fumarasa Mitocondrial (ScFUM) de centeno:-

2.2.3.1. Identificación y Secuenciación del gen ScFUM:-

Para aislar el ADNc específico del gen *ScFUM* de centeno, diseñamos un par de “primers” (Apéndice I) en base a las regiones conservadas entre las secuencias de los genes de fumarasa (*FUM*) de arroz y cebada. Uno de estos “primers” fue diseñado en una posición próxima al codón de iniciación y el otro “primers”, próximo al codón de terminación.

La amplificación fue llevada a cabo empleando los ADNc de los cultivares de centeno “Ailés”, “Imperial”, “Petkus” y la línea consanguínea “Riodeva” obtenidos de raíces tras la exposición de las plantas al aluminio durante 24 horas. Los productos de PCR con un tamaño similar al esperado fueron clonados y secuenciados siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos indican que el gen *ScFUM* está constituido por 17 exones y 16 intrones por comparación con *B.distachyon*, que codifica para una proteína hipotética que según todos los programas de predicción utilizados es de localización subcelular mitocondrial. La región codificante del del gen *ScFUM* presenta 1485 pb en los cultivares “Ailés”, “Imperial”, “Petkus” y en la línea “Riodeva” (Figura 4.24).

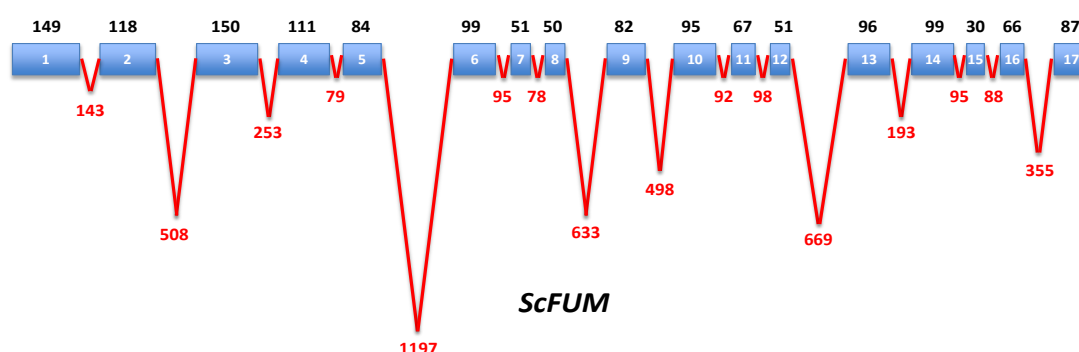


Figura 4.24. Estructura del gen *ScFUM* de centeno. Dicho gen está constituido por 17 exones (rectángulos de color azul) y 16 intrones (líneas de color rojo). El tamaño en pares de bases de cada exón se ha indicado en color negro sobre cada exón. El tamaño de los intrones es de *B.distachyon* se indica con texto de color rojo.

Todas las secuencias fueron comparadas con el clon AK251785 de cebada, con los genes *OsFUM* de arroz, *ZmFUM* de maíz y *RcFUM* de Ricino, obteniendo identidades nucleotídicas del 97%, 90%, 89%, y 80%, respectivamente (Figura 4.25).

Mediante el uso del programa rVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/about.shtml>) se llevó a cabo el estudio de la identidad entre el gen *ScFUM* de centeno y otros ADNc de este gen en cinco especies diferentes de cereales analizadas: cebada, trigo, *B. distachyon*, arroz y maíz (Figura 4.25). Las regiones que presentan una homología nucleotídica significativa se muestran como segmentos más oscuros y resulta evidente que el gen más próximo al *ScFUM* de centeno es el de trigo, seguido del de cebada. Igualmente, la menor identidad con el gen *ScFUM* de centeno la muestra el gen de Ricino.

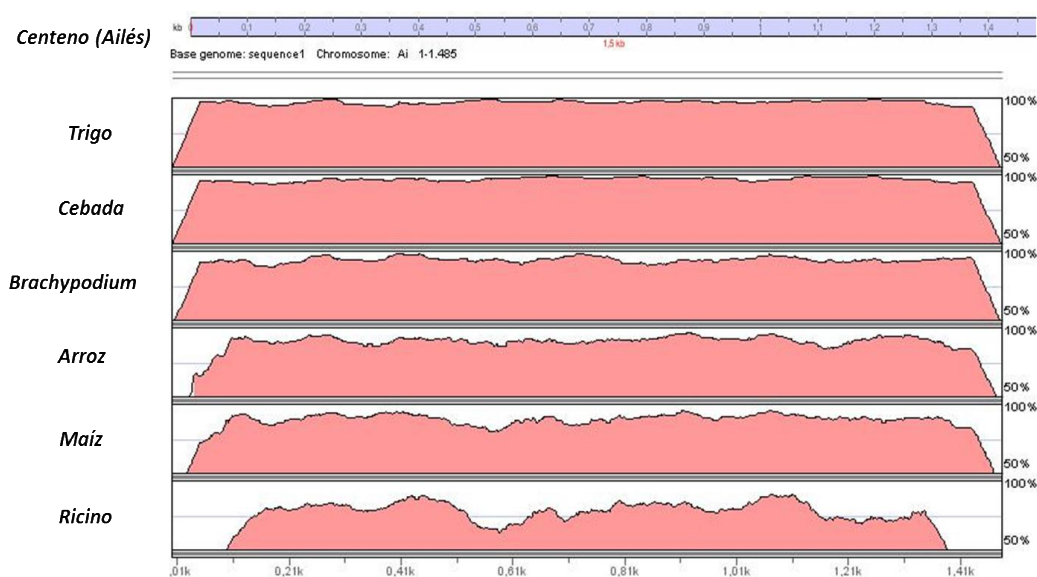


Figura 4.25. Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen *ScFUM* del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas y con Ricino. Comparación llevada a cabo con el programa rVISTA. Ordenadas de arriba hacia abajo de mayor identidad a menor identidad.

El gen *ScFUM* codifica para una proteína hipotética de 495 aminoácidos. Esta proteína presenta un peso molecular teórico de 53,066 kDa y un punto isoeléctrico de 7,69; que fue calculado mediante el uso de programa “Vector NTI”. La proteína *ScFUM* hipotética comparte un 99% de identidad y similitud con la proteína de trigo, cebada y *Brachypodium* (Figura 4.26). En la misma figura se muestra el porcentaje de identidad y similitud entre *ScFUM* y las proteínas correspondientes de arroz, maíz, *Arabidopsis thaliana*, tomate y patata. La proteína de patata es la menos parecida con 82% y 90% de identidad y similitud, respectivamente.

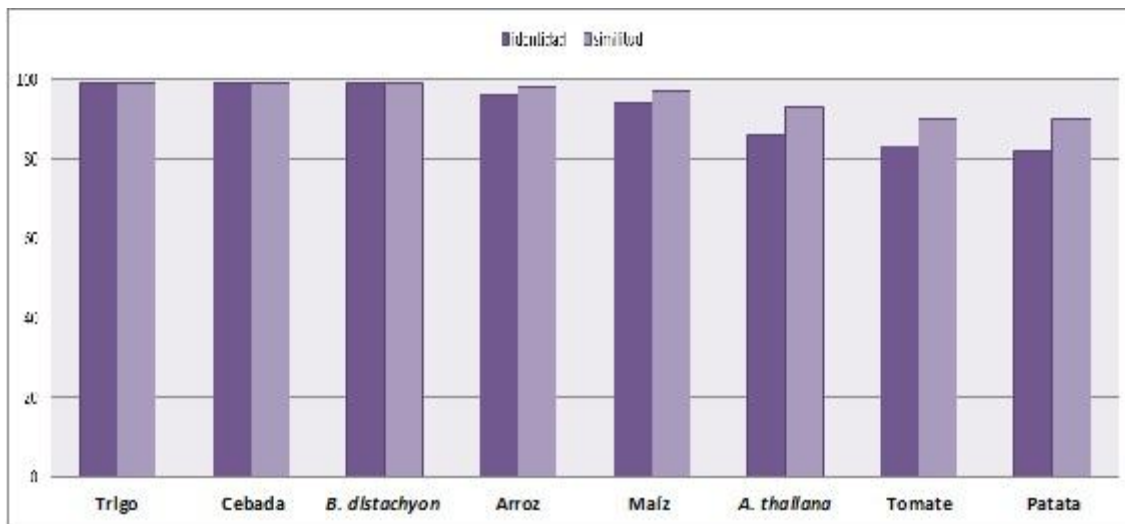


Figura 4.26 Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de la hipotética proteína codificada por el gen *ScFUM* de centeno y las secuencias de las proteínas otras especies de Poáceas, de *Arabidopsis thaliana*, de tomate y patata. Ordenadas de izquierda a derecha de mayor a menor identidad y similitud.

2.2.3.2. Localización cromosómica del gen *ScFUM*:-

Para localizar el gen *ScFUM* en un cromosoma concreto de centeno llevamos a cabo amplificaciones utilizando “primers” específicos de centeno que fueron diseñados en base a las secuencias de *ScFUM*, del cultivar de centeno Imperial, y de la secuencia *TaFUM*, del cultivar de trigo “Chinese spring”. El producto específico de la amplificación en centeno fue detectado en el centeno parental “Imperial”, en el anfiploide CS.I (que tiene todos los cromosomas de trigo y centeno) y la línea de adición disómica con el cromosoma 4R, estando ausente en las demás líneas de adición y en el trigo parental “Chinese Spring” (Figura 4.27).

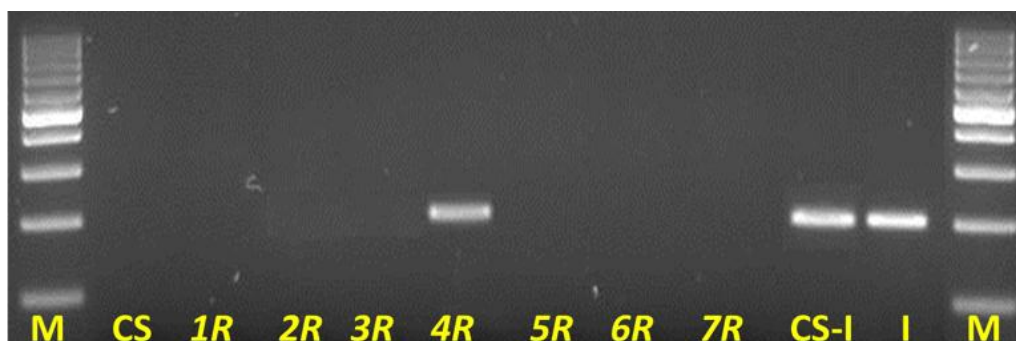


Figura 4.27. Localización cromosómica del gen *ScFUM* de centeno. Trigo (*Triticum aestivum*) parental Chinese Spring (CS), centeno (*Secale cereale*) parental Imperial (I). Anfiploide trigo-centeno (CS-I), líneas de adición disómicas trigo-centeno (Chinese Spring-Imperial) 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R. M: marcador de peso molecular (100 a 3000 pb).

2.2.3.3. Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína ScFUM de centeno:-

La estructura secundaria de la proteína hipotética *ScFUM* de centeno fue deducida utilizando el servidor para la predicción de estructuras proteicas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). El dominio FUM de la proteína *ScFUM* de centeno comparte una identidad del 72.34% con la estructura cristalina de la fumarato hidratasa humana. Para crear un modelo tridimensional de la proteína *ScFUM* de centeno utilizamos el programa SWISS-MODEL. Este programa identificó, como patrón para todas las secuencias de la fumarasa mitocondrial de centeno, la fumarato hidratasa humana 3e04 (con una resolución de 1.95 Å) descrita por Kavanagh, K.L, y col. En todos casos, la identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos fue del 72%. Todos los modelos obtenidos estaban formados por 18 hélices α y ninguna lámina β . Estos modelos fueron evaluados empleando las herramientas mencionadas previamente en este trabajo, obteniendo altos valores de confianza. La Figura 4.28. muestra el modelo proteico generado para la proteína *ScFUM* de centeno (cultivar Petkus) visto mediante el software Jmol (www.jmol.org).

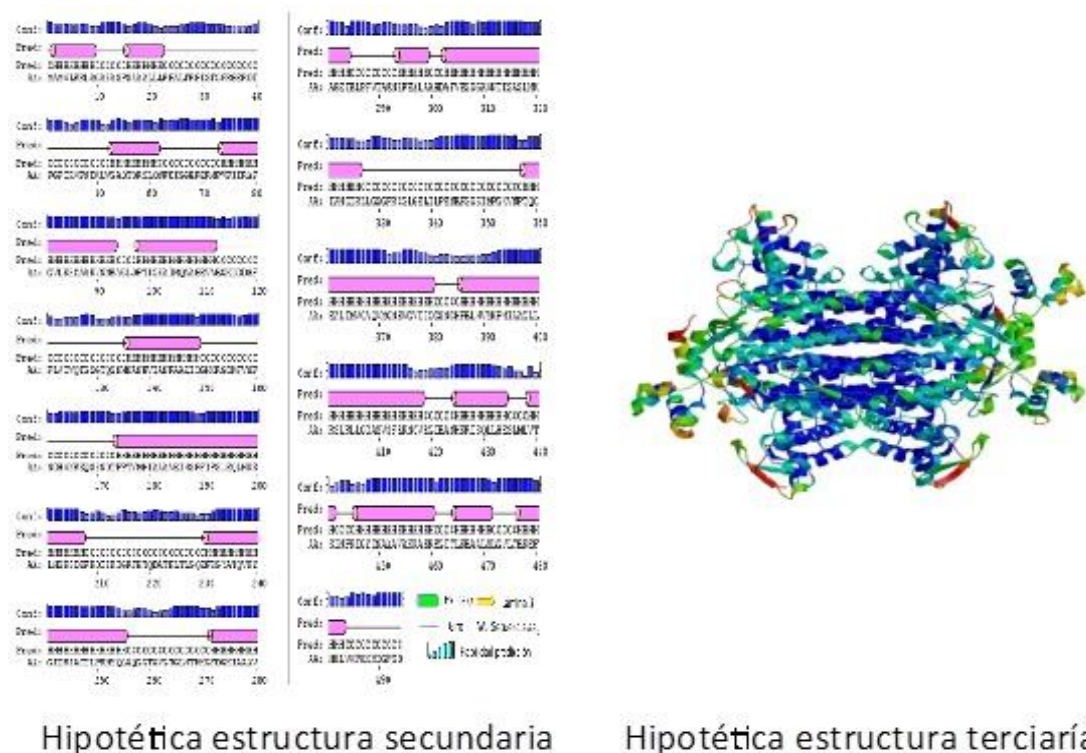


Figura 4.28. A la izquierda la hipotética estructura secundaria obtenida con el PSIPRED v3.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para la hipotética proteína *ScFUM* de centeno. La estructura secundaria está constituida por 18 regiones α hélice y ninguna región lámina β . A la derecha la hipotética estructura terciaria de *ScFUM* del cultivar Petkus. Estructura terciaria obtenida con el programa SWISS-MODEL. La proteína de la base de datos del Protein DataBase (PDB) que presentó mayor similitud con las nuestras (72 %) fue la fumarato hidratasa humana 3e04 (con una resolución de 1.95 Å).

2.2.3.4. Análisis de la expresión del gen ScFUM:-

Una vez que obtuvimos las secuencias del gen *ScFUM* de centeno en las cuatro muestras de centeno (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) llevamos a cabo un estudio de QRT-PCR cuantitativa para estudiar la variación en la expresión del ARNm de este gen como consecuencia del estrés por Al. Para conseguir este objetivo, en primer lugar, evaluamos los niveles transcripciones del gen *ScFUM* de centeno tras exponer las plantas a aluminio a pH ácido ($\text{pH} = 4.0 \pm 0.1$) en un sistema hidropónico. Para ello, el ARN total fue extraído de los ápices de las raíces y de las hojas del cultivar tolerante Petkus así como de la línea consanguínea sensible Riodeva. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis mediante QRT-PCR.

En el caso de los **ápices radiculares** (barras de color azul) en el **cultivar Petkus**, los resultados mostrados en la (Figura 4.29 A) muestran un descenso significativo de las cantidades del ARNm del gen *ScFUM* tras 4 horas (0,41), 8 horas (0,26; disminución de cuatro veces), 12 horas (0,36) y 24 horas (0,40, disminución de dos veces y media) de exposición a aluminio a una concentración 300 μM en comparación con el control. Igualmente, las cantidades del ARNm del gen *ScFUM* en los ápices de las raíces del cultivar **Petkus** también disminuyeron tras el tratamiento de las plantas con diferentes concentraciones de aluminio durante 12 horas. Como se muestra en la Figura 4.19 C, los valores obtenidos para cada concentración fueron: 25 μM , 0,34; 50 μM , 0,35, y 100 μM , 0,45. Por ejemplo, a 300 μM disminuye aproximadamente tres veces (0,36) con respecto al caso sin Al.

En el caso de las **hojas** (barras de color rojo) en el **cultivar Petkus**, los resultados mostrados en la Figura 4.29 A muestran un aumento significativo de las cantidades de ARNm del gen *ScFUM* tras 24 horas (2,31, se duplica la cantidad) de exposición a aluminio a una concentración de 300 μM en comparación con el control. Para otros tiempos, tras 4 horas (0,69), 8 horas (1,45) y 12 horas (1,47) no se producen cambios significativos. Por otro lado, la cantidad de ARNm del gen *ScFUM* en las **hojas** del cultivar **Petkus** se indujo significativamente (aumento al doble) tras el tratamiento de las plantas a la concentración de 50 μM de aluminio durante 12 horas. Sin embargo a las demás concentraciones no se produjeron cambios significativos (Figura 4.29 C). Como se muestra en la Figura 4.29 C, los valores obtenidos para cada concentración fueron: 25 μM , 1,58; 100 μM , 1,57 y 300 μM , 1,47.

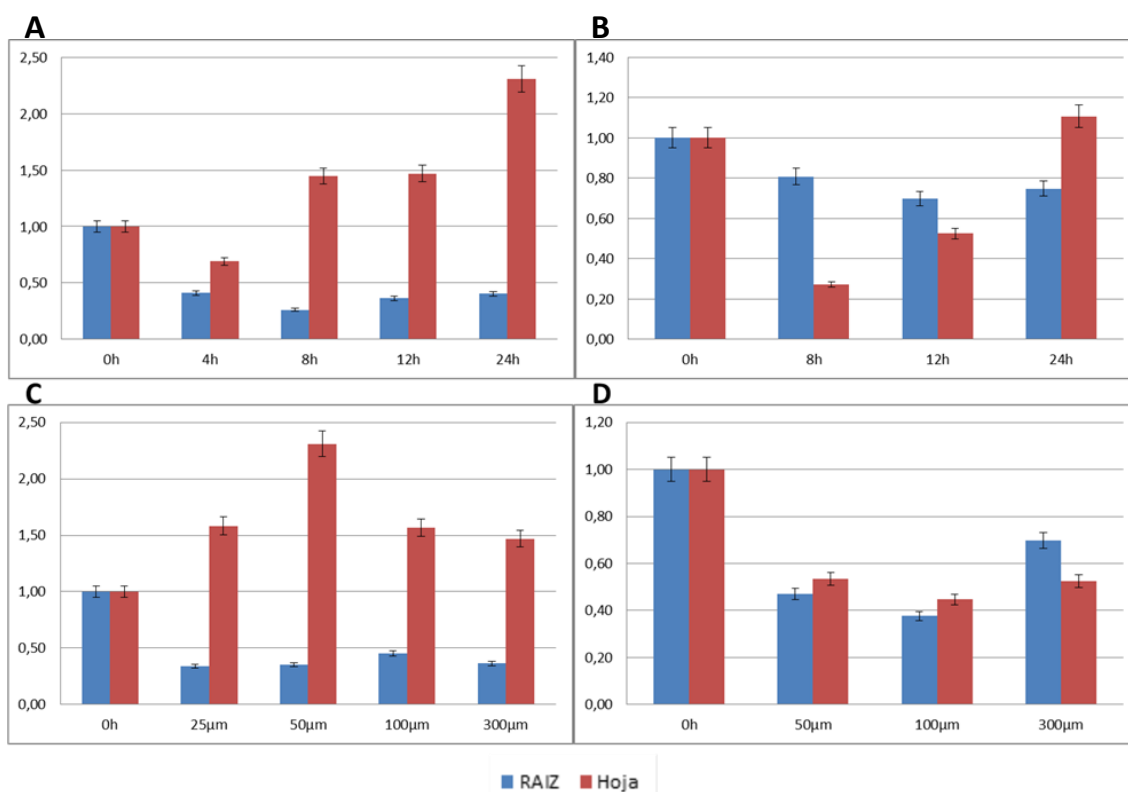


Figura 4.29. Cantidad relativa el mensajero del gen *ScFUM* en raíces (barras de color azul) y hojas (barras de color rojo) del cultivar tolerante Petkus (A y C, mitad izquierda) y de la línea consanguínea sensible Riodeva (B y D, mitad derecha) a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) con una concentración de 300 μM y a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 300 μM) a 12 horas de tratamiento.

En el caso de los **ápices radiculares** (barras de color azul) en el **línea Riodeva**, los resultados mostrados en la Figura 4.29 B indican que la cantidad de ARNm del gen *ScFUM* no varía de forma significativa con las horas de tratamiento en presencia de aluminio en el medio hidropónico. Tras 8 horas (0.81), 12 horas (0.70) y 24 horas (0.75) de exposición a aluminio a una concentración de 300 μM no disminuye ni aumenta con claridad respecto al caso sin Al

Por otra parte, la cantidad de ARNm de *ScFUM* en los ápices de las **raíces** (barras de color azul) del cultivar **Riodeva** siguieron la misma tendencia que en el cultivar Petkus tras el tratamiento de las plantas con diferentes concentraciones de aluminio durante 12 horas. Los valores obtenidos a las concentraciones 50 μM y 100 μM fueron 0.47 y 0.38, respectivamente, observándose una disminución con respecto al caso sin Al aunque no tan acusada como en Petkus (Figura 2.29 D). Pero a 300 μM (0,7) ni si quiera se reduce a la mitad con respecto al caso sin Al.

En el caso de las **hojas** (barras de color rojo) en la **línea Riodeva**, al principio (8 y 12 horas) se produce una disminución pero a las 24 horas de exposición

al Al se recupera y aparecen cantidades de ARNm de *ScFUM* semejantes a las del caso sin Al (Figura 4.29 B). Tal y como se muestra en la Figura 4.19 B, a la concentración de 300 μ M, los valores obtenidos fueron: 8 horas, 0,27; 12 horas, 0,53, y 24 horas, 1,11. Por otro lado, la expresión del gen *ScFUM* en las **hojas** (barras de color rojo) del cultivar **Riodeva** disminuye alrededor de la mitas a 50 μ M (0,53) y 100 μ M (0,45) pero a 300 μ M se recupera (0,70) y no cambia significativamente con respecto al caso sin Al (Figura 4.29 D).

2.2.3.5. Relaciones filogenéticas entre miembros de la fumarasa mitocondrial de cereales:-

Con el objeto de confirmar que el gen *ScFUM* que hemos aislado en centeno es el equivalente al de, que ha sido empleado para el diseño de los “*primers*”, estudiamos las relaciones filogenéticas con otros genes disponibles en las bases de datos del NCBI. Una vez que identificamos y caracterizamos el gen *ScFUM* llevamos a cabo la búsqueda de secuencias homólogas a la fumarasa mitocondrial en cereales mediante el empleo de la aplicación GenBank BLAST y analizamos las relaciones filogenéticas entre los cDNAs y las proteínas de diferentes especies de cereales con el programa MEGA 5.05 (Tamura y col 2007).

En todos los casos, se emplearon tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y once modelos distintos de análisis para las secuencias de nucleótidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Maximum Composite Likelihood*, *Jukes-Cantor*, *Tajima Nei*, *Kimura 2-parameter*, *Tamura 3-parameter*, *General Time Reversible*, *Tamura Nei* y *Hasegawa-Kishino-Yano*). En el caso de las secuencias de nucleótidos de los ADNc se obtuvieron un total de 33 (3 x 11) dendrogramas. De igual forma, para la comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética codificada por *ScFUM*, se utilizaron tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y nueve modelos distintos de análisis de las secuencias de aminoácidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Equal input*, *Dayhoff*, *Jones-Taylor-Thornton (JTT)*, *Dayhoff model with Freqs. (+F)*, *WAG model*, *WAG with Freqs. (+F)*). Por tanto, en las comparaciones de proteínas se obtuvieron un total de 27 (3 x 9) dendrogramas. En todos los casos se utilizó el programa “Mega 5.05” (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura y col 2011) para obtener todos los dendrogramas. El valor de “*Bootstrap*” empleado en todos los casos fue 10.000.

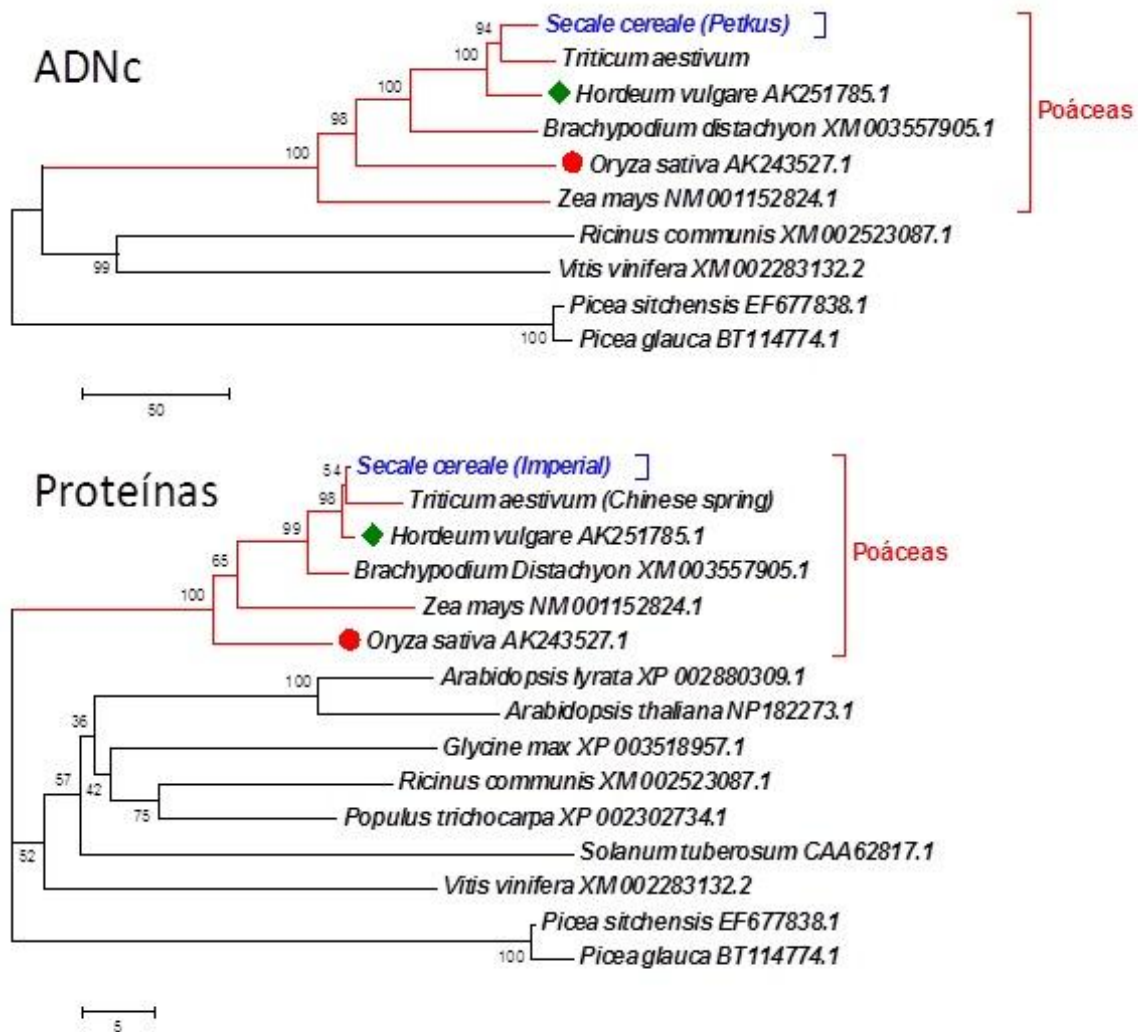
En todos los casos, los diferentes dendrogramas obtenidos con distintos métodos de agrupamiento y con diferentes estimadores de los cambios nucleotídicos o, en su caso, de los cambios de aminoácidos, tenían la misma estructura. Es decir, siempre mostraban los mismos agrupamientos (“*cluster*”) y subagrupamientos (“*subcluster*”). Además, los valores de “*bootstrap*” obtenidos en todos los casos fueron bastante elevados, indicando que los dendrogramas obtenidos y los “*clusters*” y “*subclusters*” observados son bastante consistentes.

Con el fin de identificar grupos de genes ortólogos (o niveles de ortología) a partir del análisis de los “*clusters*”, empleamos el programa LOFT 2.2. Los diversos métodos de sustitución de aminoácidos y de agrupamiento utilizados para obtener los árboles filogenéticos de los ANDc y las proteínas de la familia del gen FUM de cereales dieron lugar a un dendrograma con la misma estructura y la misma topología (Figura 4.30).

El dendrograma para los ANDc (Figura 4.30 parte superior) se encuentra dividido en dos “*clusters*” principales. Por un lado se agrupan todas las especies de Poáceas y por otro *Ricinus communis*. El ADNc de *ScFUM* en centeno, trigo y cebada se encuentran en el agrupados en el mismo “*subcluster*”. *Brachypodium distachyon* se encuentra más próximo a trigo, centeno y cebada que arroz y maíz. El más alejado de todos, utilizada como especie fuera de grupo es *Ricinus communis*.

El dendrograma para las proteínas (Figura 4.30, parte inferior) presentó una estructura muy semejante al obtenido con los ADNc. Hay un grupo que contiene a las Poáceas y otro en el que se encuentran el resto de las especies comparadas. De nuevo, centeno, trigo y cebada están juntos en el mismo subgrupo y *B. distachyon* se encuentra más próximo a trigo, centeno y cebada que el arroz y el maíz. Las dos especies del género *Solanum* están juntas en el mismo “*subcluster*”.

Por último, las relaciones filogenéticas obtenidas apoyan que la secuencia de centeno es ortóloga de las secuencias de cebada y arroz y de las secuencias de otras especies de Poáceas, como trigo, *B. distachyon* y maíz. Además, estos resultados apoyan la localización cromosómica del gen *ScFUM* en el cromosoma 4R de centeno, ya que las secuencias ortólogas de *B. distachyon* y la de arroz están en cromosomas sinténicos con los de trigo y centeno.



Neighbour Joining, N° de diferencias, Bootstrap: 10.000

Figura 4.30: Parte superior: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) del gen *ScFUM* en diversas especies de Poáceas y con ricino. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios nucleotídicos empleado fue el N° de diferencias (*N° of differences*). “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Parte inferior: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética del gen *ScFUM* en diversas especies de Poáceas y otras especies vegetales. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios de aminoácidos empleado fue el de *Poisson*. “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Las líneas de color rojo marcan el “cluster” de Poáceas. Los círculos de color rojo indican la secuencia de arroz de partida y los rombos de color verde la secuencia de cebada. Con texto de color azul se ha indicado la secuencia de fumarasa obtenida en esta tesis.

2.2.3.6. Diversidad molecular en centeno y poáceas:-

Hemos estudiado la variabilidad del ADNc del gen *ScFUM* completo y en los 17 exones en los tres cultivares de centeno tolerantes (“Ailés”, “Imperial”, “Petkus”) y en la línea consanguínea sensible (“Riodeva”). También hemos analizado la variabilidad entre diferentes especies de Poáceas, incluida centeno. En la Tabla 4.11 se indican algunos de los parámetros de diversidad estimados con el programa DnaSP v5 en las comparaciones entre las cuatro

muestras de centeno analizadas. Entre los parámetros estimados se encuentra el número de sitios polimórficos (SNPs), el número de cambios sinónimos y no sinónimos. La diversidad detectada entre las muestras de centeno en este gen es muy escasa, solamente se detectan SNPs en los exones 1,11 y 17. El resto de los exones no presentó variación. El exón más variable fue el 11. Dos de los cultivares analizados presentaron la misma secuencia de nucleótidos, por lo que solamente se han encontrado tres haplotipos (Tabla 4.13). Otro dato interesante es que los cinco SNPs detectados en el ADNc completo entre los centenos estudiados dan lugar a cinco cambios no sinónimos (Tablas 4.11 y 4.13).

Tabla 4.11. Variabilidad detectada entre las cuatro muestras de centeno (Ailes, Imperial, Petkus y Riodeva. Analizada por exones y para el ADNc completo de *ScFUM*.

Centenos (4 secuencias)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	ADNc
Nº total de secuencias	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Nº total de posiciones o sitios	149	118	150	111	84	99	51	50	82	95	67	51	96	99	30	66	87	1485
Indels (Inserciones/deleciones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	148	118	150	111	84	99	51	50	82	95	65	51	96	99	30	66	85	1480
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	5
Sitio variable (<i>singleton</i>)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	5
Sitios variables parsimónicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº total cambios sinónimos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº total cambios no sinónimos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	5

Cuando se comparan los ADNc del gen FUM en diferentes especies de Poáceas (incluido centeno) se observa como era de esperar una diversidad mucho más elevada que en las comparaciones entre las muestras de centeno. En este caso los 17 exones del gen muestran variación. El exón más variable es, en este caso, el 5 con una media de 31 SNPs por cada 100 nucleótidos. Cuando se comparan las seis especies de Poáceas, el número de cambios sinónimos (244) es mayor que el de no sinónimos (44). Además, en el exón 1 se detecta un Indel (Inserción/delección).

En la (Tabla 4.13) podemos comparar la variabilidad detectada en los ADNc completos entre las cuatro muestras de centeno con la observada entre las seis especies de Poáceas. Como era de esperar la diversidad nucleotídica entre especies de Poáceas (0,07995) es muy superior a la encontrada entre muestras de *Secale cereale* (0,00168). De nuevo este dato se confirma cuando nos fijamos en el grado de conservación de las secuencias que es de 0,997 (muy

elevado) para las muestras de centeno y de 0,814 (bastante inferior) para las especies de Poáceas.

Tabla 4.12. Variabilidad detectada entre seis especies de Poáceas, incluida centeno (un total de 6 secuencias, las mismas que las incluidas en el dendrograma de la Figura 4. 30). Analizada por exones y para el ADNc completo de FUM.

Poáceas (6 secuencias)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	ADNc
Nº total de secuencias	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Nº total de posiciones o sitios	173	118	150	111	84	99	51	50	82	95	67	51	96	99	30	66	87	1509
Indels (Inserciones/deleciones)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitios invariables (monomórficos)	107	98	128	90	58	78	39	45	66	84	58	41	77	82	23	59	65	1198
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	28	20	22	21	26	21	12	5	16	11	9	10	19	17	7	7	22	273
SNPs/100	16	17	14	19	31	21	23	10	19	12	13	20	20	17	23	11	25	18
Sitio variable (<i>singleton</i>)	17	11	18	14	21	14	9	2	13	5	8	8	14	11	5	3	13	186
Sitios variables parsimónicos	11	9	4	7	5	7	3	3	3	6	1	2	5	6	2	4	9	87
Nº total cambios sinónimos	20	24	20	21	17	16	9	8	14	13	9	10	18	17	6	7	15	244
Nº total cambios no sinónimos	10	0	5	2	7	6	1	0	2	0	1	0	3	1	1	1	4	44

Tabla 4.13. Variabilidad detectada en los ADNc completos del gene *ScFUM* entre diferentes cultivares de centeno y entre distintas especies de Poáceas (incluida centeno). Parámetros de diversidad genética estimados con el programa DnaSP v5.

<i>ScFUM</i>	Centenos	Poáceas
Nº total de secuencias	4	6
Nº total de posiciones o sitios	1485	1509
Indels (Inserciones/deleciones)	0	1
Sitios invariables (monomórficos)	1480	1198
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	5	273
Sitio variable (<i>singleton</i>)	5	186
Sitios variables parsimónicos	0	87
Número de haplotipos, h	3	6
Diversidad haplotípica	0,8333	1
Diversidad nucleotídica, π	0,00168	0,07995
Conservación secuencia	0,997	0,814
Nº total cambios sinónimos	0	244
Nº total cambios no sinónimos	5	44

2.2.4. Comparación de las cantidades de ARNm entre el cultivar tolerante y la línea consanguínea sensible en todos los genes analizados:-

Una de las cuestiones más importantes relacionadas con la posible implicación de los genes analizados en la tolerancia al aluminio consiste en averiguar si hay mayor o menor cantidad de los ARNm de los genes estudiados (*ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScFUM* y *ScCS*) en el cultivar tolerante (Petkus) o en la

línea consanguínea sensible (Riodeva). Para ello, hemos comparado tanto en las raíces como en las hojas, la cantidad de ARNm del cultivar tolerante con la de la línea sensible tanto sin Al (0 horas) como con Al (24 horas) a 300 μ M, para cada gen. No se trata de comparar las cantidades de ARNm de genes distintos, se trata de comparar las cantidades del ARNm del mismo gen en tolerante y sensible.

En las raíces sin Al (0 horas) siempre hay mayor cantidad del ARNm en el cultivar tolerante (Petkus) que en la línea sensible (Riodeva), siendo esta situación válida para todos los genes (Figura 4.31 izquierda). Las cantidades relativas en Riodeva, para cada gen, con respecto a Petkus (valor 1) son 0,11 (*ScMDH1*), 0,31 (*ScMDH2*), 0,33 (*ScFUM*) y 0,14 (*ScCS*). Esto significa que en las raíces de Riodeva sin Al hay 9 veces menos ARNm de *ScMDH1*, 3 veces menos ARNm de *ScMDH2*, 3 veces menos ARNm de *ScFUM* y 7 veces menos ARNm de *ScCS* que en las raíces de Petkus.

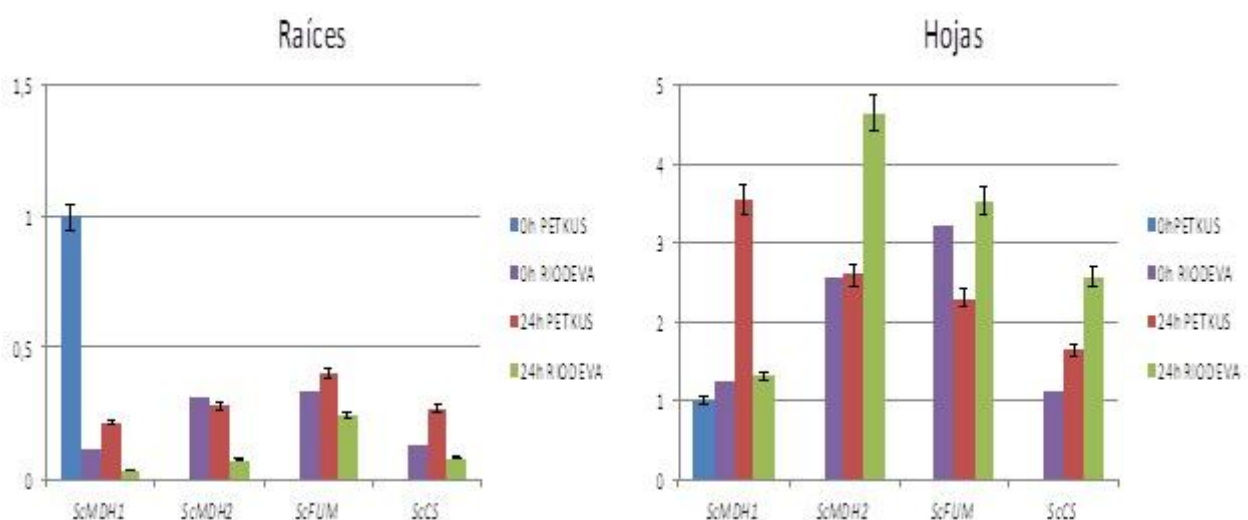


Figura 4.31. Comparación entre el cultivar tolerante (Petkus) y la línea consanguínea sensible (Riodeva) de las cantidades relativas de los ARNm de los distintos genes analizados en esta tesis. En todos los casos se ha asignado el valor 1 al caso del cultivar tolerante (Petkus) sin Al (0 horas). Solamente se ha puesto en la figura una sola vez la barra azul correspondiente al cultivar tolerante Petkus sin Al (0 horas) en el caso del ARNm del gen *ScMDH1*. Para los demás genes se ha omitido la barra azul ya que sería igual a la de *ScMDH1* (valor 1 de referencia).

Una situación semejante se produce en las raíces pero con Al a las 24 horas, es decir, hay más ARNm en las raíces del cultivar tolerante (Petkus) que en las raíces de la línea sensible Riodeva después de 24 horas de tratamiento con Al (Figura 4.31 izquierda). Lo primero que se puede observar es que el tratamiento con Al produce una disminución notable de las cantidades de los ARNm de todos los genes. Las cantidades relativas en Riodeva a 24 horas, para cada gen, con respecto a Petkus sin Al (0 horas) son 0,04 (*ScMDH1*), 0,07 (*ScMDH2*), 0,24 (*ScFUM*) y 0,08 (*ScCS*). Esto significa que en las raíces de

Riodeva con Al hay (0,22/0,04) 5,5 veces menos ARNm de *ScMDH1*, (0,28/0,07) 4 veces menos ARNm de *ScMDH2*, (0,40/0,24) 31,6 veces menos ARNm de *ScFUM* y (0,27/0,08) 3,4 veces menos ARNm de *ScCS* que en las raíces de Petkus con Al.

La situación en la hojas del cultivar tolerante (Petkus) y la línea sensible (Riodeva) es bastante distinta a la de las raíces. Sin Al la cantidad de ARNm de *ScMDH1* (1,25) en Riodeva no cambia prácticamente con respecto a Petkus (valor 1), la cantidad del ARNm de *ScMDH2* aumenta 2,58 veces, la del ARNm de *ScFUM* aumenta 3,22 veces y la del ARNm de *ScCS* no cambia (1,13). Con Al (24 horas) en las hojas de Riodeva la cantidad de ARNm de *ScMDH1* disminuye (3,55/1,32) 2,7 veces, la de ARNm de *ScMDH2* aumenta (2,59/4,63) 1,8 veces, la del ARNm de *ScFUM* aumenta algo (2,31/3,53) 1,5 veces y la cantidad del ARNm de *ScCS* también aumenta un poco, (1,64/2,57) 1,5 veces.

2.2.5. Comparación entre las cantidades de ARNm de las raíces y las hojas para los distintos genes estudiados:-

Teniendo en cuenta que los tratamientos con Al se dan en cultivo hidropónico, que las raíces son las que están sometidas directamente al contacto con el Al y que el principal síntoma de la toxicidad por Al a pH ácido es la inhibición del crecimiento de las raíces; creemos que tiene especial importancia averiguar si los ARNm de los genes estudiados se expresan más o menos intensamente en las raíces o en las hojas de las plántulas utilizadas en los ensayos. Para ello, hemos llevado a cabo dicha comparación entre hojas y raíces tomando siempre como referencia la raíz a la que hemos asignado el valor 1.

Los resultados están resumidos en la Figura 4.32. En el caso del cultivar tolerante Pekus (parte izquierda de la Figura) en todos los casos se observa que la cantidad de ARNm de los distintos genes es mayor en las raíces que en las hojas, tanto sin Al (0 horas) como con Al (24 horas). Las diferencias son siempre más acusadas en los casos sin Al. En las raíces de Petkus sin Al hay 33 veces (0,03) más ARN de *ScMDH1*, 100 veces (0,01) más de ARNm de *ScMDH2*, 25 veces (0,04) más de ARN de *ScFUM* y 50 veces (0,02) más de ARNm de *ScCS* que en las hojas. En las raíces de Petkus con Al hay 2,27 veces (0,44) más de ARNm de *ScMDH1*, 8,3 veces (0,12) más de ARNm de *ScMDH2*, 4,76 veces (0,21) más de ARNm *ScFUM* y 7,1 veces más (0,14) de ARNm de *ScCS* que en las hojas.

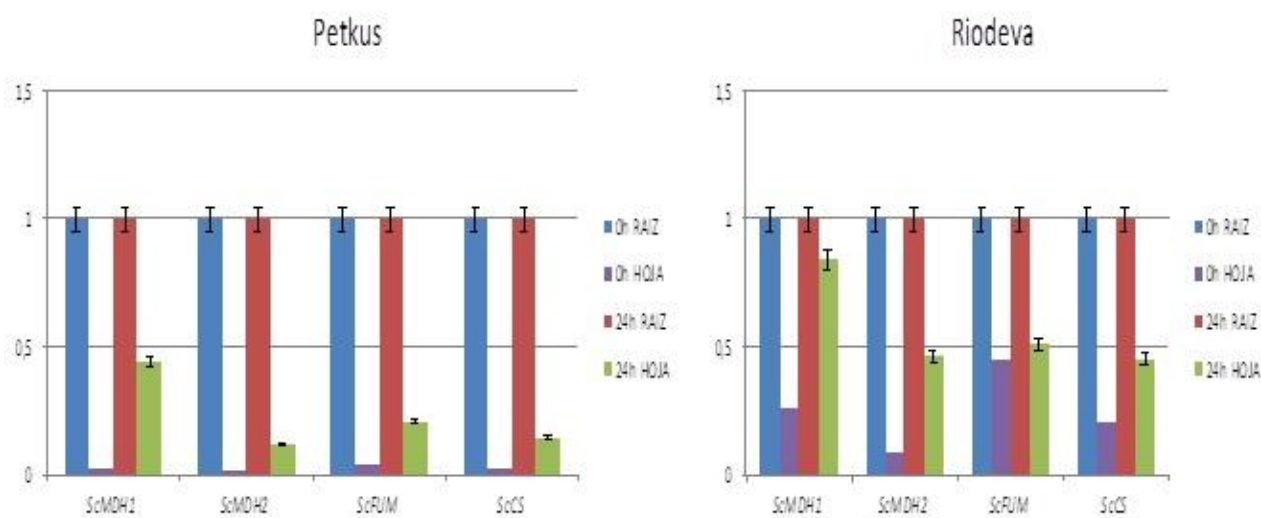


Figura 4.32. Comparación entre las raíces y las hojas de las cantidades relativas de los ARNm de los distintos genes analizados en esta tesis. Las comparaciones se han llevado a cabo sin Al (0 horas) y con Al (24 horas) a 300 μ M y tanto en el cultivar tolerante Petkus (a la izquierda) como en la línea sensible Riodeva (a la derecha). En todos los casos se ha asignado el valor 1 de referencia a las raíces.

Una situación semejante se observa en el caso de la línea sensible Riodeva (parte derecha de la Figura 4.32), las cantidades de los mensajeros para todos los genes son mayores en las raíces que en las hojas, tanto sin Al como con Al, aunque la diferencias entre raíces y hojas son menos acusadas que en el caso del cultivar tolerante Petkus.

En las raíces de Riodeva sin Al hay 3,8 veces (0,26) más ARN de *ScMDH1*, 11 veces (0,09) más de ARNm de *ScMDH2*, 2,2 veces (0,45) más de ARN de *ScFUM* y 4,7 veces (0,21) más de ARNm de *ScCS* que en las hojas. En las raíces de Riodeva con Al hay 1,19 veces (0,84) más de ARNm de *ScMDH1*, 2,2 veces (0,46) más de ARNm de *ScMDH2*, 2 veces (0,51) más de ARNm *ScFUM* y 2,2 veces más (0,45) de ARNm de *ScCS* que en las hojas.

2.2.6. Comparación de la expresión (cantidades relativas) de los ARNm de los genes aislados en esta tesis con las cantidades de los ARNm de genes candidatos de tolerancia o involucrados en la tolerancia en estudios previos:-

Durante el desarrollo de los estudios de expresión de los ARNm de los genes *ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS* y *ScFUM* también nos hemos preguntado sobre la expresión de los ARNm de otros genes previamente descritos en otros trabajos como genes de tolerancia o implicados en la tolerancia al estrés por Al. El primer gen candidato de tolerancia al estrés por Al se aisló en trigo (Sasaki y col 2004), el gen *TaALMT1*, que codifica para un transportador de malato

activado por Al. El segundo gen candidato se caracterizó en sorgo, el gen *SbMATE*, que codifica para un transportador de citrato activado por Al (Magalhaes y col 2007). Poco tiempo después en cebada se identificó otro gen de la familia MATE, *HcAACT1* o *HvMATE1*, involucrado en la tolerancia en esta especie (Furukawa y col 2007). En centeno el primer gen de tolerancia, el gen *ScALMT1*, de la familia ALMT se caracterizó por (Fontecha y col 2007) y , posteriormente, por Collins y col (2008). Posteriormente, se han descrito otros genes de la familia MATE que también parecen estar involucrados en el estrés por Al en esta especie, *ScMATE1* (*ScFRDL1*) y *ScMATE2* (*ScFRDL2*) (Yokosho y col 2010, Silva-Navas y col 2011). Por último, otro de los genes involucrados en la tolerancia al aluminio, *STOP1*, es un factor de transcripción necesario para la expresión de *ALMT* y de *MATE*, entre otros genes, en *Arabidopsis* y arroz (Iuchi y col 2007). Por tal motivo, también hemos analizado la expresión de los ARNm de los genes *ScALMT1*, *ScMATE1* y *STOP1* en el cultivar tolerante Petkus y en la línea consanguínea Riodeva.

Los resultados obtenidos están resumidos en la (Figura 4.33.) En la parte superior (B) se indican los resultados en las raíces y en la inferior (B) los de las hojas. Siempre se ha tomado como referencia (valor 1) para comparar el caso sin Al (0 horas). Las demás situaciones corresponden al tratamiento con Al a 300 μ M durante 24 horas. Las barras con valores positivos significan un aumento en la cantidad del ARNm del gen o genes correspondientes, las barras con valores negativos indican una disminución de la cantidad del ARNm del gen o genes indicados. Lo primero que llama nuestra atención es que en las raíces de Petkus (barras azules) y Riodeva (barras rojas) las cantidades de los ARNm de todos los genes caracterizados en esta tesis disminuyen como consecuencia del tratamiento durante 24 horas con Al.

Sin embargo las cantidades de los ARNm de *ScALMT1* y *ScMATE1* aumentan en Petkus, mientras que en Riodeva solo aumenta *ScALMT1*. El aumento más intenso (25 veces con respecto al caso sin Al) se produce en el caso del ARNm de *ScALMT1* en el cultivar tolerante (Petkus). El ARNm de *ScSTOP1* parece disminuir algo en las raíces Petkus y no cambia en las de Riodeva. En lo que respecta a las hojas (Figura 4.33 B), la situación es diferente.

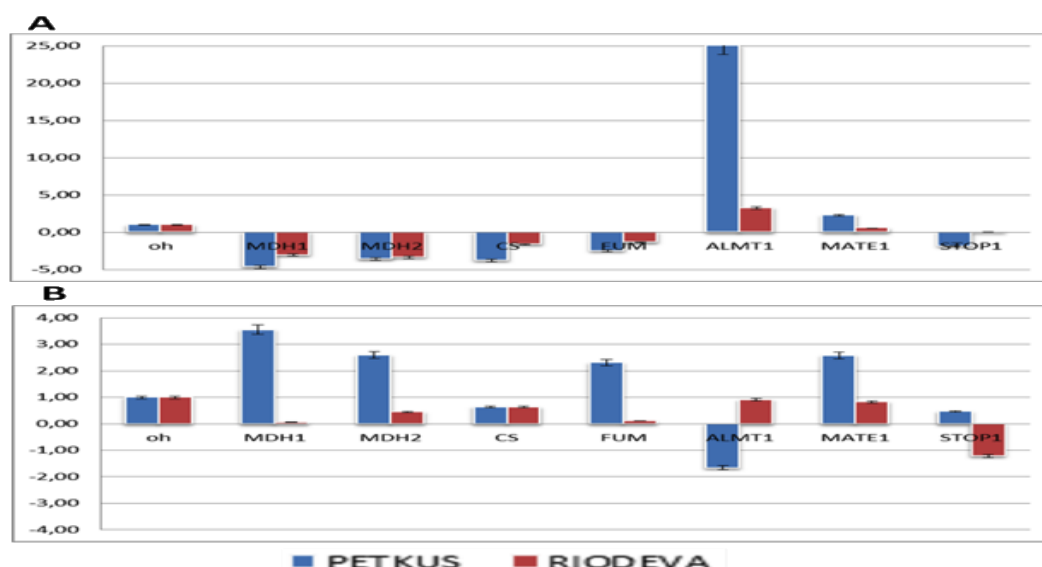


Figura 4.33. Cantidades relativas de los mensajeros de los genes *ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS*, *ScFUM*, *ScALMT1*, *ScMATE1* y *ScSTOP1* en raíces (A, parte superior) y en hojas (B, parte inferior) del cultivar tolerante Petkus (barras azules) y de la línea consanguínea Riodeva (barras rojas). En todos los casos se ha tomado como referencia (valor 1) el caso sin Al (0 horas). Todas las demás situaciones se corresponden con el tratamiento con Al a 24 horas y 300 μ M. Las barras con valores positivos indican aumento de la cantidad del ARNm del gen correspondiente, mientras que las que poseen valores negativos significan disminución de la cantidad de ARNm del gen o genes correspondientes.

2.2.7. Localización subcelular de las proteínas hipotéticas codificadas por los genes *ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS* y *ScFUM* aislados en este trabajo:-

Para tratar de averiguar la localización subcelular de las proteínas hipotéticas codificadas por los genes analizados en este trabajo utilizamos el programa “TargetP 1.1” (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP). Este programa predice la localización subcelular de proteínas eucarióticas en base a la presencia de una secuencia señal en el extremo N-terminal. Además de este programa también se emplearon otros recomendados en la base de datos del NCBI. Por lo tanto, este programa es capaz de deducir un valor de probabilidad en caso de que la proteína presente un péptido de transición cloroplastídico (cTP), un péptido señal mitocondrial (mTP) o un péptido señal de la ruta secretora (SP). El programa define la fiabilidad de la predicción de la localización subcelular más probable. En el caso de las proteínas analizadas (MDH1, MDH2, CS y FUM), el programa predice una localización mitocondrial con valores de probabilidad muy altos en todos los casos (0.892, 0.831, 0.935 y 0.815, respectivamente). También se obtuvo la misma localización subcelular mitocondrial cuando se emplearon otros programas de análisis. Por tanto, las localizaciones subcelulares mitocondriales obtenidas coinciden con

lo esperado, ya que las secuencias de partida seleccionadas de cebada y arroz correspondían en todos los casos a genes que codifican para proteínas mitocondriales.

Tabla 4.14. Valores de probabilidad obtenidos con el programa TargetP 1.1 que predice localizaciones subcelulares a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteínas. (**Len**) N° de aminoácidos de la proteína hipotética, (**cTP**) Probabilidad para Péptido de transición cloroplastídico, (**mTP**) Probabilidad para Péptido señal mitocondrial, (**SP**) Probabilidad para Péptido señal de la ruta secretora, (**Loc**) Localización subcelular más probable, (**M**) Mitocondrial, (**RC**) Clase de fiabilidad, de 1 a 5, donde 1 es indicativo de la predicción más fuerte. Por lo tanto, cuanto menor es el valor de RC, más segura es la predicción

Proteína	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
MDH1	340	0.126	0.892	0.004	0.044	M	2
MDH2	340	0.092	0.831	0.005	0.041	M	2
CS	472	0.023	0.935	0.009	0.084	M	1
FUM	494	0.044	0.815	0.196	0.007	M	2

2.3. Identificación y caracterización de un gen involucrado en el mantenimiento de la pared celular en centeno:-

La pared celular es una barrera física entre el ambiente y el contenido de las células vegetales y sus modificaciones están a menudo asociadas con respuestas de defensa en las plantas (Vorwerk y col 2004). Las pectinas son los componentes principales de la pared en bacteria, hongos y plantas. Las pectinas son polisacáridos altamente complejos que pueden llegar a contener hasta 17 monosacáridos diferentes y son ricas en ácido galacturónico. En dicotiledóneas las pectinas representan entre el 30-35% de la pared celular en peso seco. En las pectinas es posible distinguir cuatro dominios pépticos de poslisacaridos: homogalacturonano (HGA), rhamnogalacturonano I (RGI), rhamnogalacturonano II (RGII) y xylogalacturonano (XGA), que difieren tanto en la estructura de la macromolécula como en la presencia y diversidad de cadenas laterales (Pelloux y col 2007).

Las Pectin metilesterasas (PME) son enzimas ubicuas que modifican el grado de metilesterificación de las pectinas. La acción de las PME modifica la estructura de las pectinas de la pared celular y estas modificaciones están asociadas con cambios en el pH y en el contenido iónico de la pared celular y están relacionados con respuestas de estrés y cambios durante el desarrollo vegetal. Las PME de plantas están involucradas en procesos reproductivos y vegetativos, incluyendo la formación del polen y la madera. Además, las PME están implicadas en las interacciones planta-patógeno. Las enzimas de PME

pertenecen a una amplia familia multigénica. En *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* y *Oryza sativa* se han anotado 66, 89 y 35 marcos de lectura abiertos (ORF) como hipotéticas PME. El bajo número de ORF en arroz es consistente con el dato de que los HGA (homogalacturonano) son menos abundante en monocotiledones que en dicotiledones (Pelloux y col2007).

2.3.1. Identificación y caracterización de una pectin metilesterasa (ScPME) de centeno:-

Con el fin de aislar un gen *ScPME* que pudiera estar relacionado con la tolerancia al aluminio, se extrajo el ADN de hojas jóvenes siguiendo el procedimiento que se ha descrito previamente en métodos. Tras esto, diseñamos parejas de “*primers*” (Apéndice I) basándonos en la secuencia del gen *ZmPME* (pectin methylesterase de maíz, MAGI 4.0_158804) (Krill y col 2010). Este gen parece modificar su expresión en maíz por el estrés con Al. Los productos de la PCR con ADNg de centeno que mostraron el tamaño esperado fueron clonados de acuerdo al procedimiento descrito métodos. Posteriormente, la secuencia completa del ADNg de *ScPME* en el cultivar Ailés fue determinada mediante el empleo de la técnica “*The Genome Walking*” (Paseo cromosómico) con el kit Universal Genome Walker (*Clontech*, USA). Inicialmente amplificamos un fragmento de 1639 pb a partir del ADNg de las hojas de centeno. Posteriormente, se diseñaron nuevos “*primers*” (Apéndice I) a partir de la secuencia del fragmento de gen *ScPME* del cultivar Ailés para amplificar las secuencias completas de PME en las demás muestras de centeno (Petkus, Imperial y Riodeva) mediante PCR. Para completar el análisis de la secuencia del gen *ScPME*, las regiones promotora (“*upstream*”) y la región “*downstream*” fueron aisladas a partir de las muestras de Imperial, Petkus y Riodeva utilizando nuevas parejas de “*primers*” (Apéndice I). En la (Figura 4.34) se representa esquemáticamente la estructura en exones e intrones del gen *ScPME*.

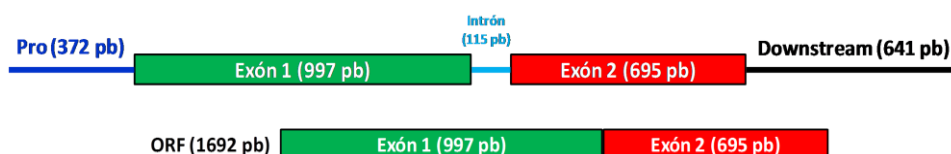


Figura 4.34. Esquema de la estructura del gen *ScPME* de centeno. En gen contiene dos exones de color verde y rojo, respectivamente, y un intrón pequeño de 115 pares de bases. La región promotora aislada por el momento tiene 372 pb y se indica con una línea de color azul oscuro, la región “*downstream*” tiene 641 pb y se indica por una línea de color negro.

La secuencia del ADNg que hemos obtenido para el gen *ScPME* contiene un fragmento del promotor de 372 pb, un primer exón de 997 pb, un intrón de 115 pb, un segundo exón de 695 pb y una región “*dowstream*” de 641 pb. El marco de lectura abierto (ORF) presenta una longitud de 1692 pb, incluyendo el codón de terminación. Todas las secuencias del gen de la pectin metil esterasa (*ScPME*) de centeno fueron comparadas con las correspondientes secuencias de trigo, *B. distachyon*, sorgo, maíz y arroz. Los valores de identidad obtenidos fueron 96%, 87%, 86%, 86%, respectivamente (Figura 4.35).

Como en los genes anteriores, llevamos a cabo análisis de la identidad encontrada entre el ADNc del gen *ScPME* y los ADNc de los genes PME de seis especies diferentes de Poáceas (Figura 4.35). Para ello, empleamos el programa rVISTA, (<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/about.shtml>). Como se puede observar, el gen más próximo al *ScPME* de centeno es el de trigo, seguido de *B. distachyon*. El gen que mostró una menos identidad con el de centeno fue el de arroz. El gen *ScPME* codifica para una proteína hipotética de 563 aminoácidos. La proteína *ScPME* hipotética presenta un peso molecular estimado de 6.12 kDA y un punto isoelectrico de 8.91, que fue calculado gracias al programa Vector NTI. La (Figura 4.36) muestra los valores obtenidos para las identidades y similitudes entre la proteína *ScPME* hipotética de centeno y las proteínas PME correspondientes en trigo (97% y 98%), *B. distachyon* (91% y 96%), arroz (85% and 93%), sorgo (84% y 92%), maíz (74% y 82%) y *Arabidopsis thaliana* (41% y 62%).

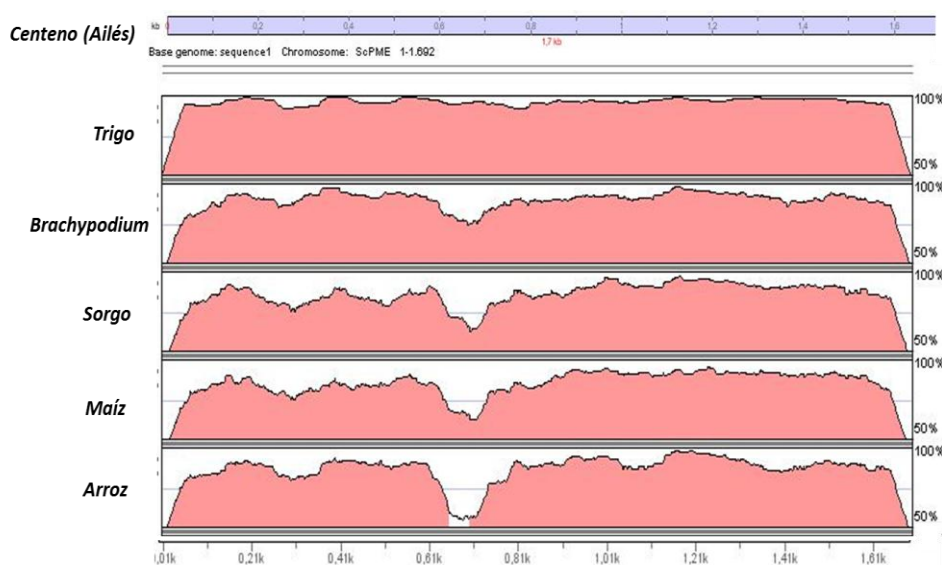


Figura 4.35. Comparación de las identidades entre las secuencias de ADNc del gen *ScPME* del centeno tolerante Ailés con las de otras especies de Poáceas: trigo, *B. distachyon*, sorgo, maíz y arroz. Comparación llevada a cabo con el programa rVISTA. Ordenadas de arriba hacia abajo de mayor identidad a menor identidad.

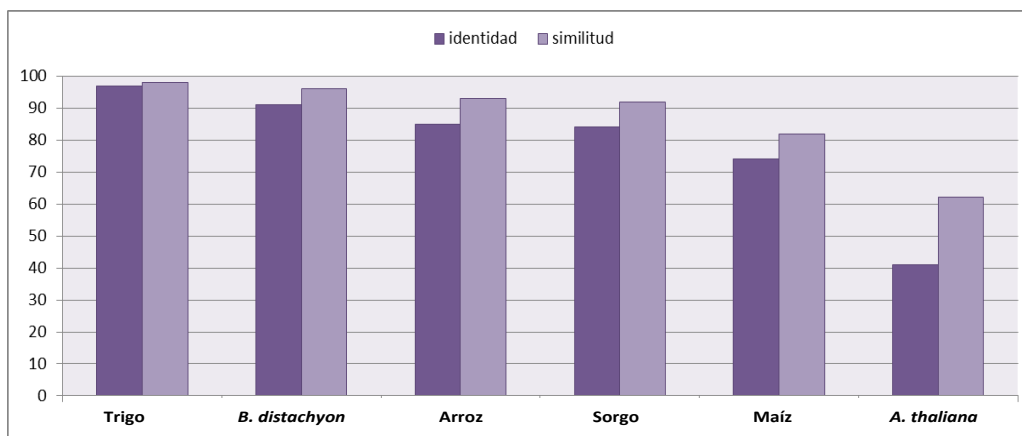
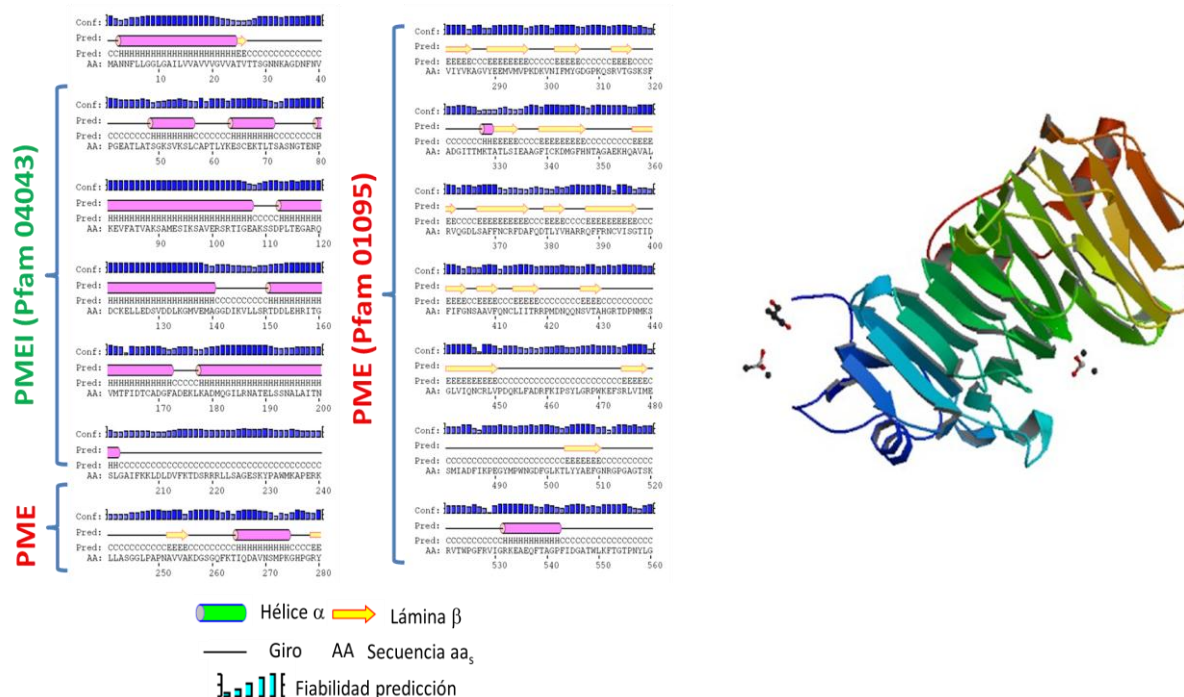


Figura 4.36 Porcentajes de identidades y similitudes entre las secuencias de aminoácidos de la hipotética proteína codificada por el gen *ScPME* de centeno y las secuencias de las proteínas PME de otras especies de Poáceas y de *Arabidopsis thaliana*. Ordenadas de izquierda a derecha de mayor a menor identidad y similitud.

2.3.2. Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína ScPME de centeno:-

La hipotética estructura secundaria de la proteína *ScPME* de centeno se obtuvo utilizando el servidor para la predicción de estructuras proteicas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). En esta proteína se encontraron varios dominios descritos previamente en otras PME. El dominio PME1 (Pfam04043) contenía 7 hélices α y una pequeña lámina β , y el dominio PME (Pfam01095) mostraba 3 hélices α y 18 láminas β . El dominio PME de la proteína *ScPME* de centeno comparte un 55% de identidad con el de la proteína PME de zanahoria (*Daucus carota*, UniProt, P83218; PDB, 1GQ8). La proteína PME de zanahoria ha sido purificada y el análisis de la proteína cristalizada mostró que pertenece a la familia de las proteínas “*right-handed parallel β -helix proteins*” (Goodenough and Carter 2000). Con el fin de crear un hipotético modelo tridimensional de la proteína *ScPME* de centeno empleamos el programa SWISS-MODEL (ver Material y Métodos). El modelo proteico generado para la proteína *ScPME* de centeno (cultivar Ailés) visto mediante el software Jmol (www.jmol.org) se muestra en la Figura 4.37.



Hipotética estructura secundaria

Hipotética estructura terciaria

Figura 4.37. A la izquierda la hipotética estructura secundaria obtenida con el PSIPRED v3.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para la hipotética proteína *ScPME* de centeno. En color verde se ha indicado el dominio PMEI constituido por 7 regiones α hélice y una pequeña región lámina β . En color rojo se ha marcado el dominio PME constituido por 3 regiones α hélice y 18 regiones lámina β . A la derecha la hipotética estructura terciaria de *ScPME* del cultivar Petkus. Estructura terciaria obtenida con el programa SWISS-MODEL. La proteína de la base de datos del Protein DataBase (PDB) que presentó mayor similitud con las nuestras (55 %) fue la PME de zanahoria (*Daucus carota*).

2.3.3. Estructura de la proteína *ScPME* esperada:-

Los dominios de la proteína hipotética codificada por el ADNc del gen *ScPME* se detectaron mediante la utilización del software InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) del EMBL-EBI. La enzima *ScPME* presenta los siguientes dominios: dominio del péptido señal (SP) y dominio transmembrana (TM) en el extremo N-terminal, el dominio inhibidor de la Pectin Metilesterasa [PMEI (Pfam04043)] a continuación de los dominios SP y TM, después un motivo de procesamiento el dominio PM, (con las secuencias RRLL o RKLL) y , por último, el dominio Pectin Metilesterasa [PME (Pfam01095)] en el extremo C-terminal (Figura 4.38). La proteína *ScPME*, según la predicción, es una proteína soluble. Por lo tanto, estos resultados indican que la proteína contiene todos los dominios que se esperan en las proteínas PME del grupo o tipo 2.

Las enzimas PME del grupo 2 de plantas pertenecen a una gran familia multigénica. En *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* y *Oryza sativa* se han descrito 43, 51 y 19 marcos de lectura abiertos (ORFs) que codificarían para hipotéticas proteínas PMEs del grupo 2 (Pelloux y col 2007), respectivamente. Sin embargo, de los 19 ORFs de arroz, únicamente un ORF presenta todos los dominios característicos del grupo 2, el motivo de procesamiento RKLL y, según la predicción, también es una proteína soluble. Además, de esta proteína de arroz, también hay otras proteínas PME del grupo 2, con todas las características previamente descritas y con una elevada identidad con la proteína *ScPME*, que aparecen en diferentes bases de datos de secuencias de plantas. Algunas de ellas son las proteínas PME de *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor* y *Brachypodium distachyon*.

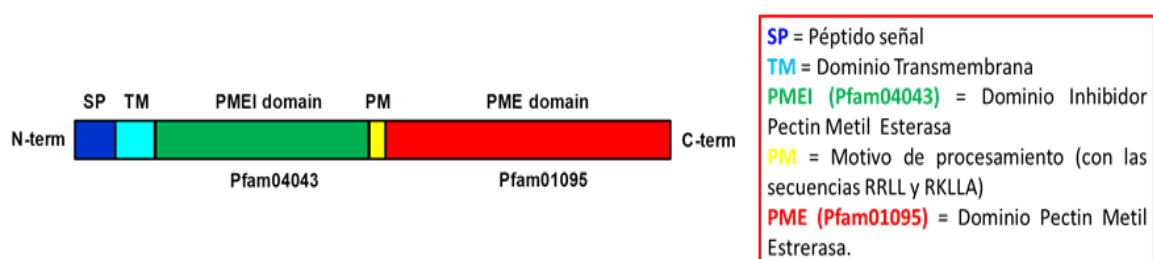


Figura 4.38. Esquema con los diferentes dominios encontrados en la proteína hipotética *ScPME* por el programa InterProScan. Desde el extremo amino terminal (N-term) hasta el extremo carboxilo terminal (C-term) el programa predice los siguientes motivos: Péptido señal (SP), Transmembrana TM, Inhibidor de la Pectin Metilesterasa (PMEI), motivo de procesamiento (PM) y Dominio Pectín Metilesterasa (PME). Cada dominio se ha representado con un color diferente.

2.3.4. Localización cromosómica del gen *ScPME*:

Con el fin de localizar el gen *ScPME* en un brazo cromosómico de centeno, llevamos a cabo amplificaciones empleando parejas de “primers” específicos de centeno que se diseñaron a partir de las secuencias del gen *ScPME* del cultivar de centeno Imperial y del gen *PME* del cultivar Chinese spring de *Triticum aestivum* (Apéndice I). Con estas parejas de “primers” específicas de centeno amplificamos el ADNg de el centeno (I) y trigo (CS) parentales (Imperial y Chinese Spring, respectivamente), de las siete líneas de adición disómicas trigo centeno (1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R), del anfiploide que tiene todos los cromosomas de trigo y centeno (CS-I) y de la línea de adición ditelocéntrica (Figura 4.39). El fragmento amplificado específico de centeno estaba presente en el parental centeno (I), en el anfiploide trigo-centeno (SC-I), en la línea de adición 2R y en la línea ditelocéntrica 2RL. Dichos fragmento

estaba ausente en el resto e las líneas. Por tanto, el gen *ScPME* de centeno se localiza en al brazo largo del cromosoma 2R.

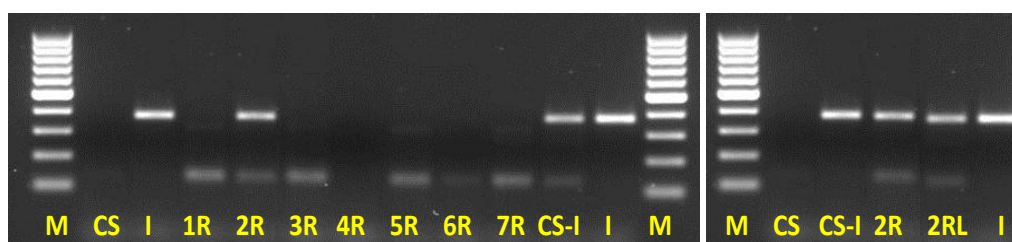


Figura 4.39. Localización cromosómica del gen *ScPME* de centeno. Trigo (*Triticum aestivum*) parental Chinese Spring (CS), centeno (*Secale cereale*) parental Imperial (I). Anfiploide trigo-centeno (CS-I), líneas de adición disómicas trigo-centeno (Chinese Spring-Imperial) 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R. Línea de adición ditelocéntrica 2RL. M: marcador de peso molecular (100 a 3000 pb).

2.3.5. Determinación del patrón de expresión del gen *ScPME* mediante RT-PCR Semicuantitativa:-

Para tratar de estimar los cambios en las cantidades del mensajero del gen *ScPME* de centeno por estrés con Al llevamos a cabo estudios mediante QRT-PCR (PCR cuantitativa). Sin embargo, las cantidades de este ARNm son bastante bajas y son difíciles de cuantificar los cambios empleando esta metodología. A pesar de ello, los resultados obtenidos mediante QRT-PCR indican que hay mayor cantidad del ARN-m del gen *ScPME* en las raíces que en las hojas y que el tratamiento con Al produce una disminución en las cantidades de este ARNm en las raíces del cultivar tolerante Petkus.

Debido a esta dificultad a la hora de cuantificar mediante QRT-PCR los cambios en la expresión del ARNm de *ScPME* decidimos llevar a cabo estudios de RT-PCR semicuantitativa. Para ellos realizamos extracciones de ARN, tanto en raíces como en hojas, a diferentes tiempos (0, 4, 8, 12 y 24 horas) a una concentración de 300 μ M de Al y también llevamos a cabo extracciones a diferentes concentraciones 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M a 12 horas de tratamiento con Al. En ambos casos (diferentes tiempos y distintas concentraciones) las extracciones se realizaron a partir de plantas del cultivar tolerante (Petkus) y de la línea consanguínea sensible (Riodeva). En todos los casos el gen que se utilizó como control fue el gen de actina, cuya expresión no varía ni en las hojas, ni en las raíces, a diferentes tiempos de tratamiento con Al ni a diferentes concentraciones de Al. En la PCR semicuantitativa se empleó el ADNc obtenido mediante transcripción inversa de 200 ng de ARN total recogido tras los tratamientos a diferentes tiempos y concentraciones de Al y el número de ciclos fue 30.

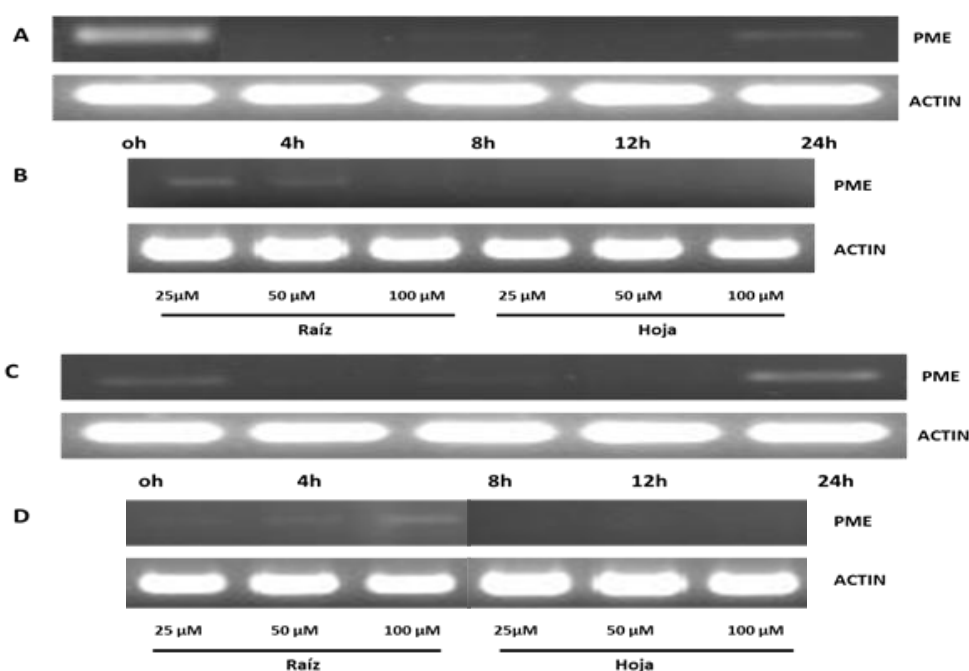


Figura 4.40. Cambios en las cantidades del ARNm del gen *ScPME* por estrés con Al mediante RT-PCR semicuantitativa. (A) Raíces del cultivar tolerante Petkus tratadas con Al a diferentes tiempos. (B) Raíces y hojas del cultivar tolerante Petkus tratadas con diferentes concentraciones de aluminio. (C) Raíces del cultivar sensible Riodeva tratadas con aluminio a diferentes tiempos. (D) Raíces y hojas del cultivar sensible Riodeva tratadas con diferentes concentraciones de aluminio

En la Figura 4.40 se resumen los resultados obtenidos en la RT-PCR semicuantitativa. En primer lugar, el gen utilizado como control (la actina) no sufre cambios en su cantidad como consecuencias de los tratamientos a diferentes tiempos y concentraciones ni en las hojas ni en las raíces. Sin embargo, la cantidad del ARNm del gen *ScPME* del cultivar tolerante Petkus se reduce por el tratamiento con Al a 300 μM , de manera más intensa a las primeras horas (4, 8 y 12 horas) (Figura 4.20 A). En las hojas del cultivar tolerante Petkus y en las hojas de la línea sensible Riodeva no se detecta prácticamente expresión del ARNm de *ScPME*. En las raíces del cultivar tolerante Petkus a distintas concentraciones a las 12 horas de tratamiento se observa una disminución de la cantidad de ARNm a medida que aumenta la concentración (Figura 4.20 B). En las raíces de la línea sensible Riodeva a diferentes tiempos se puede ver que durante las primeras horas (4, 8 y 12 horas) se produce una disminución de la cantidad del ARNm del gen *ScPME*, pero a las 24 horas se observa un aumento con respecto al caso sin Al (0 horas). (Figura 4.20 C). En las raíces de la línea sensible (Riodeva) se observa que a medida que aumenta la concentración tras 12 horas de tratamiento con Al va aumentando la cantidad de ARNm del gen *ScPME*.

También es importante destacar que la cantidad de ARNm de *ScPME* en las raíces del cultivar tolerante (Petkus) sin Al (0 horas) es bastante más alta que en las raíces de la línea sensible (Riodeva). Sin embargo, después del tratamiento con Al a 300 μ M tras 24 horas de exposición, la situación se invierte ya parece existir una mayor cantidad en las raíces del cultivar sensible que en las raíces del tolerante.

2.3.6. Relaciones filogenéticas entre miembros de la pectin metil esterasa de cereales:-

Para confirmar que el gen *ScPME* aislado en centeno es el ortólogo del gen de maíz empleado para el diseño de los “*primers*” estudiamos las relaciones filogenéticas con otros genes disponibles en las bases de datos del NCBI. Por tanto, una vez que obtuvimos la secuencia del gen *ScPME* llevamos a cabo la búsqueda de secuencias homólogas a la Pectin Metilesterasa en otras especies de Poáceas mediante la utilización de la aplicación GenBank BLAST. Posteriormente, analizamos las relaciones filogenéticas entre los ANDc, por un lado ,y entre las proteínas de diferentes especies vegetales con el programa MEGA 5.05 (Tamura y col 2007).

En todos los casos, se emplearon tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y once modelos distintos de análisis para las secuencias de nucleótidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Maximum Composite Likelihood*, *Jukes-Cantor*, *Tajima Nei*, *Kimura 2-parameter*, *Tamura 3-parameter*, *General Time Reversible*, *Tamura Nei* y *Hasegawa-Kishino-Yano*). En el caso de las secuencias de nucleótidos de los ADNc se obtuvieron un total de 33 (3 x 11) dendrogramas. De igual forma, para la comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética codificada por *ScPME*, se utilizaron tres métodos de agrupamiento (*Neighbour Joining*, *Maximum likelihood* y *Minimum evolution*) y nueve modelos distintos de análisis de las secuencias de aminoácidos (*Nº of differences*, *p-distance*, *Poisson*, *Equal input*, *Dayhoff*, *Jones-Taylor-Thornton (JTT)*, *Dayhoff model with Freqs. (+F)*, *WAG model*, *WAG with Freqs. (+F)*). Por tanto, en las comparaciones de proteínas se obtuvieron un total de 27 (3 x 9) dendrogramas. En todos los casos se utilizó el programa “Mega 5.05” (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura y col 2011) para obtener todos los dendrogramas. El valor de “*Bootstrap*” empleado en todos los casos fue 10.000.

En todos los casos, los diferentes dendrogramas obtenidos con distintos métodos de agrupamiento y con diferentes estimadores de los cambios nucleotídicos o, en su caso, de los cambios de aminoácidos, tenían la misma estructura. Es decir, siempre mostraban los mismos agrupamientos (“cluster”) y subagrupamientos (“subcluster”). Además, los valores de “bootstrap” obtenidos en todos los casos fueron bastante elevados, indicando que los dendrogramas obtenidos y los “clusters” y “subclusters” observados son bastante consistentes. Para identificar grupos de genes ortólogos (o niveles de ortología) a partir del análisis de los “clusters” utilizamos el programa LOFT 2.2 (van der Heijden y col 2007).

En el caso de los ADNc (Figura 4.41) solamente encontramos unas pocas secuencias de ADNc de Poáceas que tuvieran una identidad elevada con la secuencia de centeno. Con las secuencias de estas especies obtuvimos las relaciones filogenéticas indicadas en la (Figura 4.41) y son las mismas que hemos empleado para estudiar la variabilidad de este gen en Poáceas. Como puede observarse en el dendrograma representado en la Figura 4.41 los valores de “bootstrap” son muy elevados, siendo por tanto, muy consistentes todos los agrupamientos y ramificaciones. La secuencia más cercana a la de centeno es la de trigo, después está la de *B. distachyon* y luego la de arroz y, posteriormente, las de sorgo y maíz. Todas ellas codifican para hipotéticas Pectín Metilesterasas de tipo 2. Por tanto, la secuencia de centeno (*ScPME*) de centeno es ortóloga de las secuencias de partida de maíz (rombo de color verde) y de arroz (círculo de color rojo).

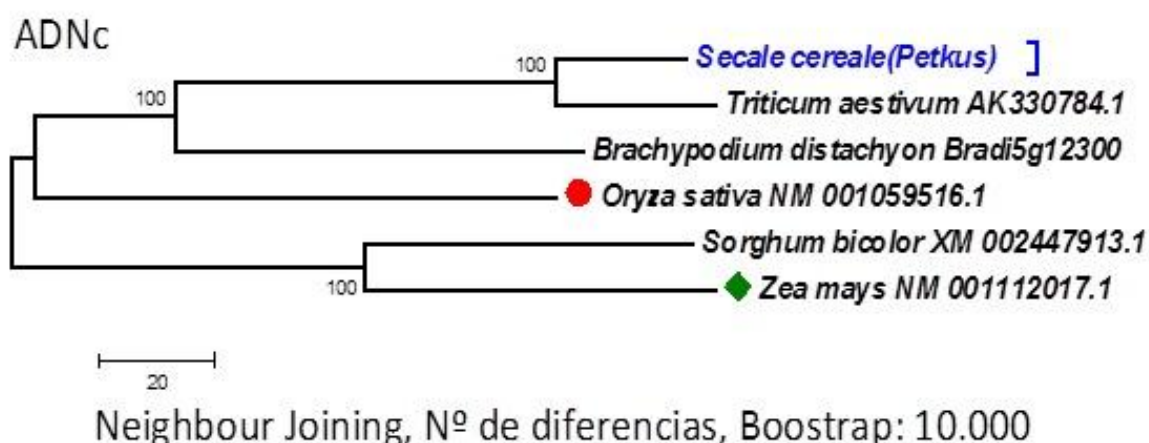


Figura 4.41: Dendrograma conseguido con las secuencias de los ADNc (ARNm) del gen *ScPME* en diversas especies de Poáceas y con ricino. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios nucleotídicos empleado fue el N° de diferencias (*N° of differences*). “Bootstrap” de 10.000 réplicas. El círculo de color rojo indican la secuencia de arroz de partida y el rombo de color verde la secuencia de maíz. Con texto de color azul se ha indicado la secuencia de pectín metilesterasa obtenida en esta tesis.

En el caso de los dendrogramas obtenidos con proteínas de PME, además de las secuencias de otras especies de Poáceas también empleamos secuencias de otras especies vegetales obtenidas en la base de datos de NCBI. En la construcción del dendrograma no se utilizaron todas las secuencias disponibles en las bases de datos, ya que en este caso era un número muy elevado y, por tal motivo, decidimos llevar a cabo una selección de aquellas que mostraron una mayor identidad y similitud con la de centeno. Como ya hemos comentado todos los dendrogramas obtenidos con las proteínas tenían la misma estructura y solamente hemos representado en la (Figura 4.42) el obtenido mediante *Neighbour Joining* y N° de diferencias.

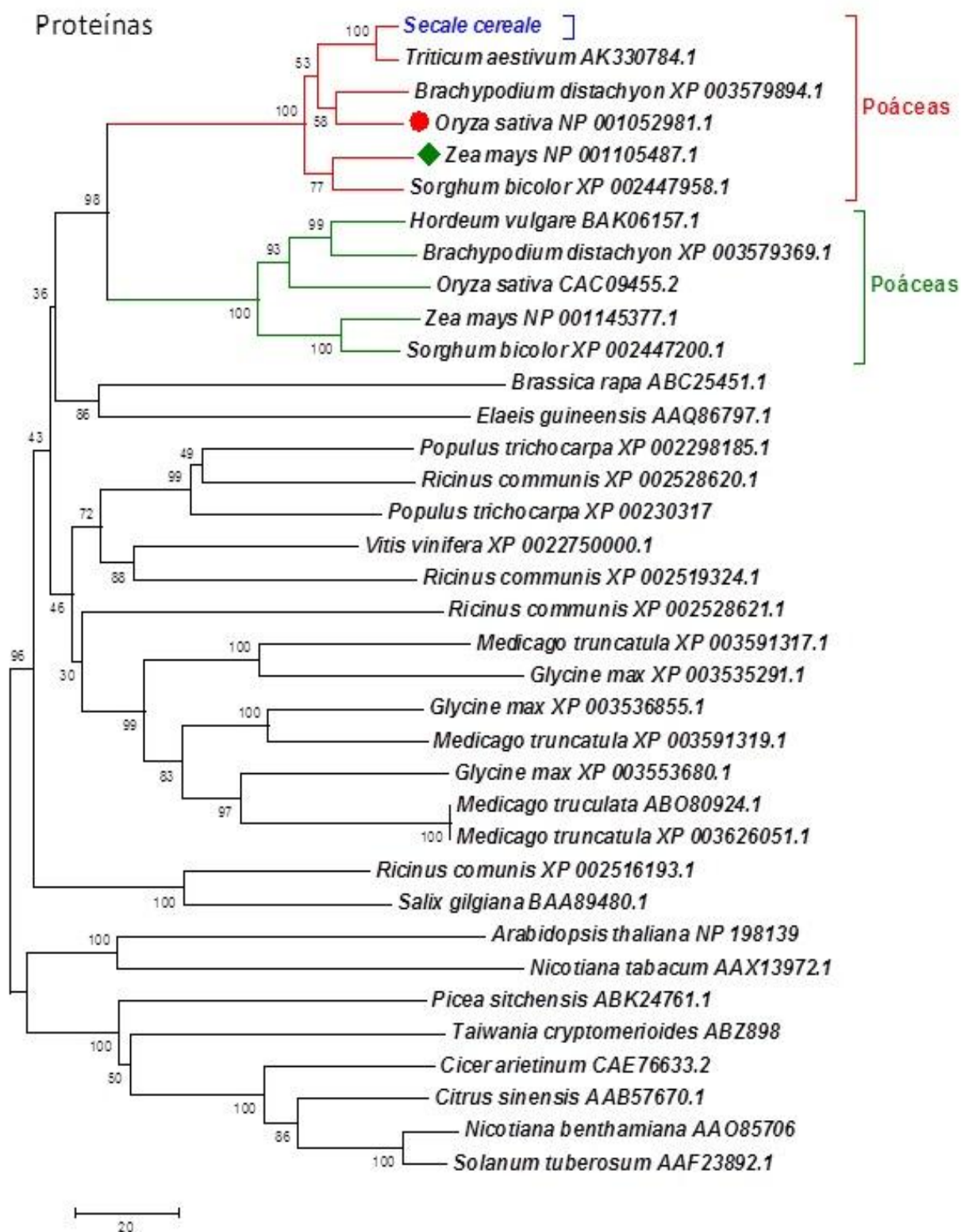
En este dendrograma hemos obtenido dos “clusters” diferentes (uno marcado con líneas rojas y otro con líneas verdes) de diferentes especies de Poáceas. El programa LOFT 2.2 indica que se trata de dos grupos de genes ortólogos distintos. La secuencia aislada en este trabajo (marcada con texto de color azul) está agrupada junto con la secuencia de maíz de procedencia (rombo de color verde) y con la de arroz (rombo de círculo de color rojo). Por tanto, nuestros resultados indican que la secuencia que hemos aislado en centeno es ortóloga de las secuencias de procedencia de maíz y arroz.

De nuevo, las relaciones filogenéticas obtenidas con proteínas indican que la más próxima a la de centeno es la secuencia de PME de trigo, después están *B. distachyon* y arroz y, por último, las secuencias de maíz y sorgo.

2.3.7. Diversidad molecular en centeno y otras poáceas:-

Como en los casos de los genes anteriores, también llevamos a cabo un análisis de variabilidad observada entre las secuencias de los ADNc completos y de los dos exones de las cuatro muestras de centeno (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y entre las secuencias de distintas Poáceas (la nuestra de centeno, trigo, *B. distachyon*, arroz, maíz y sorgo) obtenidas en la base de datos del NCBI. Dicho estudio se realizó empleando el programa DnaSP 5v5.

En la (Tabla 4.15) se resumen los datos obtenidos al comparar las cuatro muestras de centeno. El exón más variable es el 1, con 20 SNPs, es decir el número de SNPs por cada 100 nucleótidos de este exón es 2. La diversidad nucleotídica π para el ADNc es 0,00808. El número de cambios sinónimos (15) es mayor que el de no sinónimos (11).



Neighbour Joining, N° de diferencias, Bootstrap: 10.000

Figura 4.42: Dendrograma obtenido con las secuencias de aminoácidos de la proteína hipotética del gen *ScPME* en diversas especies de Poáceas y otras especies vegetales. El método de agrupamiento utilizado ha sido *Neighbour Joining* y el estimador de cambios de aminoácidos empleado fue el de N° de diferencias.. “Bootstrap” de 10.000 réplicas. Las líneas de color rojo marcan uno de los “clusters” de Poáceas. El otro “cluster” de Poáceas está marcado con líneas de color verde. El círculo de color rojo indica la secuencia de arroz de partida y el rombo de color verde la secuencia de maíz. Con texto de color azul se ha indicado la secuencia de Pectin Metilesterasa de centeno obtenida en esta tesis.

Tabla 4.15. Variabilidad detectada entre las cuatro muestras de centeno (Ailes, Imperial, Petkus y Riodeva. Analizada por exones y para el ADNc completo de *ScPME*.

Centenos (4 secuencias)	Exón 1	Exón 2	ADNc
Nº total de secuencias	4	4	4
Nº total de posiciones o sitios	997	695	1692
Sitios invariables (monomórficos)	977	690	1667
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	20	5	25
SNPs/100	2	0,72	1,48
Sitio variable (<i>singleton</i>)	15	6	20
Sitios variables parsimónicos	5	0	5
Nº total cambios sinónimos	13	2	15
Nº total cambios no sinónimos	8	3	11

En el caso de las diferentes especies de Poáceas (Tabla 4.16) la variabilidad es aún mayor, siendo igualmente superior en el exón 1 (27 SNPs/100 pb) que en el exón 2 (18,4 SNPs/100 pb). Sin embargo, entre las especies de Poáceas estudiadas el número de cambios no sinónimos (294) es bastante mayor que el de sinónimos (76).

En la (Tabla 4.17) se pueden comparar los resultados obtenidos del estudio de variabilidad con los ADNc completos del gen *ScPME* entre las muestras de centeno con los obtenidos entre las especies de Poáceas. Como era de esperar, al igual que lo sucedido con los anteriores genes analizados, la diversidad observada es bastante mayor entre especies de Poáceas que entre las muestras de *Secale cereale*. La diversidad nucleotídica π en Poáceas es de 0,11592 mientras que entre centenos es 0,00808. En correspondencia, la conservación de las secuencias es mucho mayor entre centenos (0,985) que entre Poáceas (0,759). Llama la atención la inversión en la frecuencia de los cambios sinónimos y no sinónimos, ya que estos últimos son mucho más frecuentes que los sinónimos entre Poáceas, mientras que entre centenos es al revés.

Tabla 4.16. Variabilidad detectada entre cinco especies de Poáceas, incluida centeno (un total de 5 secuencias, las mismas que las incluidas en el dendrograma de la Figura 4. 41). Analizada por exones y para el ADNc completo de PME.

Poáceas (6 secuencias)	Exón 1	Exón 2	ADNc
Nº total de secuencias	6	6	6
Nº total de posiciones o sitios	1020	691	1711
Sitios invariables (monomórficos)	719	564	1283
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	275	127	402
SNPs/100	27	18,4	23,5
Sitio variable (<i>singleton</i>)	129	67	196
Sitios variables parsimónicos	146	60	206
Nº total cambios sinónimos	55	21	76
Nº total cambios no sinónimos	188	106	294

Tabla 4.17. Variabilidad detectada en los ADNc completos del genes *PME* entre diferentes cultivares de centeno y entre distintas especies de Poáceas (incluida centeno). Parámetros de diversidad genética estimados con el programa DnaSP v5.

<i>ScPME</i>	Centenos	Poáceas
Nº total de secuencias	4	5
Nº total de posiciones o sitios	1692	1711
Sitios invariables (monomórficos)	1667	1283
Sitios variables (polimórficos) (SNPs)	25	402
Sitio variable (<i>singleton</i>)	20	196
Sitios variables parsimónicos	5	206
Número de haplotipos, h	4	5
Diversidad haplotípica	1	1
Diversidad nucleotídica, π	0,00808	0,11592
Conservación secuencia	0,985	0,759
Nº total cambios sinónimos	15	76
Nº total cambios no sinónimos	11	294

V.DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la tolerancia al estrés por Al mediante estimación del crecimiento de las raíces:-

Las pruebas de tolerancia al estrés por Al en cultivo hidropónico se basan en la medición del crecimiento de las raíces. Los dos parámetros que hemos utilizado para estimar como afecta el Aluminio al crecimiento de las raíces, RRL y RRS, han dado resultados bastante semejantes por el tratamiento. El parámetro RRL estima el porcentaje relativo de reducción del crecimiento después del tratamiento, lo que crece la raíz después del tratamiento. El estimador RRS estima el porcentaje relativo de reducción del crecimiento total de la raíz. Como se puede observar en la (Tabla 4.1) y en la Figura 4.1 la principal consecuencia del tratamiento con Al es una inhibición del crecimiento de la raíz. Ambos parámetros nos permiten clasificar a los cultivares estudiados como muy tolerantes, aquellos en los que el porcentaje de reducción es muy bajo (RRS inferior al 6% y RRL inferior al 15%) y, muy sensibles, aquellos en los que el porcentaje de reducción es bastante elevado (RRS superior al 29% y RRL superior al 72%). Entre ambos extremos tenemos toda una gama de cultivares de centeno que podríamos definir como moderadamente tolerantes.

Estos dos parámetros son los más empleados por la mayoría de los investigadores para evaluar la tolerancia al aluminio ya que se basan en mediciones de la principal consecuencia del estrés por Al, la inhibición o reducción del crecimiento de la raíz. Aunque también se han utilizado y se emplean otros métodos para evaluar la tolerancia al estrés por Al. La tinción con hematoxilina es uno de esos métodos ya que pone de manifiesto la región de la raíz en la que se acumula el Al y la cantidad de Al acumulado. Un alto grado de tinción del extremo de la raíz significa que la planta sometida al estrés por Al es sensible ya que se acumula una gran cantidad de Al. Sin embargo, la ausencia de tinción después del tratamiento significa que la planta analizada es tolerante ya que no se ha acumulado Al. Este método se ha empleado con bastante frecuencia en diferentes cultivares de trigo y cebada. Pero la mayoría de los cultivares de cebada son muy sensibles y se tiñen con intensidad a las concentraciones empleadas para evaluar cultivares de centeno. Los resultados obtenidos con nuestros cultivares indican que la tinción con hematoxilina es un buen sistema para evaluar la tolerancia en centeno, ya que los cultivares sensibles muestran un alto grado de tinción mientras que los muy tolerantes apenas presentan indicios de tinción con

hematoxilina (Figuras 4.2 y 4.3). De hecho la correlación existente entre el método de tinción con hematoxilina (HS) y los parámetros RRL y RRS es significativa y bastante elevada en el caso del parámetro RRS (0,82). Por tanto, el método HS parece un sistema fiable para evaluar la tolerancia en diferentes cultivares de centeno ya que muestra una elevada correlación (Figura 4.4) con los parámetros RRS y RRL.

Otros autores han desarrollado otros métodos que ponen de manifiesto diferentes consecuencias del estrés por Al. Dichos métodos consisten en tinciones que detectan especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizando el reactivo fluorescente DCF-DA (2', 7'-diclorofluoresceína diacetato). Tinciones que ponen de manifiesto los niveles diferenciales de aldehídos que llevan a la peroxidación lipídica (LOOH-derivados aldehídos) que pueden visualizarse en tejidos de plantas empleando el reactivo de Schiff (Yamamoto et al., 2001; Han et al., 2008). Un tercer método de tinción con Morin (Tice et al., 1992), que presenta una alta especificidad por los iones Al^{3+} y es utilizado habitualmente para detectar aluminio en tejidos de plantas (Larsen et al., 1996; Jones et al., 2006; Ezaki et al., 2007).

La tinción con Morin indica lo mismo que la tinción con hematoxilina, los cultivares sensibles muestran una tinción fluorescente verde muy intensa en los ápices de las raíces, mientras que los tolerantes no presentan tinción fluorescente (Figura 4.7). El reactivo de Schiff indica en qué lugar se produce peroxidación lipídica y en qué cantidad. Los resultados indican que se produce en las mismas zonas de la raíz en que se acumula el Al (Figura 4.6). La tinción con DCF-DA señala el lugar y la cantidad de especies reactivas de oxígeno, en particular, H_2O_2 , que se producen. De nuevo los datos indican que la producción de ROS coincide en el mismo lugar en el que se acumula el Al (Figura 4.5). Los resultados obtenidos con los cultivares de centeno indican que los cultivares tolerantes no se tiñen con la tinción fluorescente DCF-DA ni tampoco con el reactivo de Schiff, por tanto, además de no acumular Al en sus raíces (no hay tinción con Morin y con hematoxilina), no se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) ni peroxidación lipídica como consecuencia del tratamiento. Sin embargo, en los cultivares sensibles hay acumulación de Al (tinción con Morin y con hematoxilina), producción de H_2O_2 (tinción con DCF-DA) y peroxidación lipídica (tinción con reactivo de Schiff). Los cultivares tolerantes parecen estar mejor preparados para el estrés oxidativo que se produce como consecuencia del tratamiento con Al.

Por tanto, estos tres métodos de tinción (DCF-DA, Morin y Schiff) también son un buen sistema de evaluación de la tolerancia al estrés por Al en centeno.

5.2. Variabilidad del gen *ScALMT1* en diferentes cultivares de centeno:-

Hemos estudiado la variación de un segmento de 738 pb de la región promotora y la variación del exón1 (276 pb), del exón 6 (366 pb) y del intrón 5 (109 pb) en diferentes cultivares de centeno con distinto grado de tolerancia al estrés por Al. El estudio se llevó a cabo mediante amplificación con parejas de “*primers*” específicos y posterior purificación y secuenciación de los fragmentos obtenidos. Lo primero que merece la pena destacar es la gran cantidad de cultivares que presentaron dos picos de igual altura en la misma posición en el electroforegrama correspondiente (Tabla 4.3). Esta situación se detectó tanto en la región promotora, como en los exones 1 y 6 y en el intrón 5. La explicación más sencilla sería que se trata de plantas heterocigóticas, suponiendo que solamente existe una copia del gen *ScALMT1* por genoma. Según esta hipótesis 12 de los 28 cultivares (42,8%) secuenciados en la región promotora serían heterocigotos, 11 de 35 para el exón 1 (31,4%), 4 de 35 para el intrón 5 (11,4%) y 10 de 35 para el exón 6 (28,6%). Estos datos suponen unos niveles de heterocigosidad bastante elevados. Sin embargo, existen datos previos que indican la existencia de variabilidad para el número de copias de este gen en centeno (Fontecha et al. 2007; Collins et al. 2008). Por tanto, si existe más de una copia del gen *ScALMT1*, la existencia de dos picos de igual altura podría significar la existencia de al menos dos copias distintas. Nuestros resultados, por el momento, no permiten distinguir entre ambas situaciones, aunque los niveles de heterocigosidad tan elevados que existirían en el supuesto de que existiera una sola copia por genoma del gen *ScALMT1* nos hacen pensar que probablemente existen más de una copia de este gen en algunos de los cultivares analizados.

En lo referente al grado de diversidad observado en las regiones estudiadas del gen *ScALMT1*, los valores más altos de diversidad nucleotídica se encontraron en la región promotora y en el intrón 5 (Tabla 4.4), la diversidad haplotípica mayor se detectó también en la región promotora seguida del exón 6. Es necesario tener presente que estos datos significan un grado de diversidad bastante elevado para regiones codificantes (exones 1 y 6) y que pueden estar sobreestimados en el supuesto de que exista más de una copia del gen *ScALMT1* por genoma.

No hemos encontrado ninguna relación entre la variabilidad detectada en estas zonas del gen *ScALMT1* y el grado de tolerancia al estrés por Al. Los cultivares sensibles y los tolerantes no muestran diferencias en las secuencias de nucleótidos de la región promotora, de los exones 1 y 6 ni del intrón 5 que expliquen su diferente grado de tolerancia. En centeno el gen *ScALMT1* se induce por estrés con Al, sin embargo, en trigo el gen ortólogo *TaALMT1* no se induce por estrés con Al. Las diferencias en las regiones promotoras del gen *ScALMT1* y del gen *TaALMT1* son bastante acusadas y en ellas es posible que resida la diferente respuesta de estos dos genes ortólogos al estrés por Al. Los análisis de las secuencias de las regiones promotoras de diferentes cultivares de trigo han puesto de manifiesto diferencias estructurales importantes entre cultivares tolerantes y sensibles, detectándose seis haplotipos muy claros entre los cultivares que mostraban un amplio rango de tolerancia al aluminio (Sasaki et al. 2006, Raman et al. 2007). Estos datos, sugieren que en trigo las diferencias en las regiones promotoras del en *TaALMT1* pueden ser las causantes de los distintos grados de tolerancia observadas. En centeno, la información que tenemos por el momento, no permite distinguir con claridad haplotipos de la región promotora asociados con una mayor o menor tolerancia al estrés por Al. Es importante recordar, que el centeno es mucho más tolerante al estrés por Al que el trigo, de hecho, la línea consanguínea de centeno Riodeva que consideramos sensible al estrés por Al, en realidad comparada con la mayoría de los cultivares de trigo es tolerante, aunque lógicamente comparada con otros centenos es sensible. Tal vez, parte de este elevado nivel de tolerancia mostrado por centeno esté basado en que el gen *ScALMT1* de centeno es inducible por estrés con Al, mientras que el gen *TaALMT1* de trigo no se induce por Al. Probablemente, la diferencia entre inducirse o no inducirse por Al se deba a diferencias en las regiones promotoras de trigo y centeno.

La importancia de los diferentes motivos detectados en los haplotipos de los promotores de trigo no está todavía clara, pero se ha sugerido que uno o más motivos encontrados en los promotores con baja expresión han aumentado su número de copias y reordenado para derivar o dar lugar a promotores más potentes (Delhaize et al. 2007). Esta hipótesis es interesante debido a la similitud con las observaciones realizadas para el locus *Alt_{SB}* en *Sorghum*, pero obviamente requiere experimentación adicional. Aunque la expresión de *TaALMT1* es un factor importante para la tolerancia al aluminio, es importante recordar que no es el único, ya que las diferencias en la expresión génica

explican solamente la mitad de las diferencias observadas en la tolerancia (Sasaki et al. 2006, Raman et al. 2007).

En el caso del gen *HcAACT1* (*HvMATE1*) en la región promotora (“*upstream*”) aproximadamente 5 Kb antes del triplete de iniciación de la traducción, se ha encontrado una inserción de alrededor de 1Kb que está presente en las líneas de cebada tolerantes y ausente en las sensibles (Fujii et al. 2012, DOI 10.183/ncomms1726). Incluso se han obtenido plantas transgénicas de cebada con dicha inserción que muestran una mayor exudación de ácido cítrico y un mayor grado de tolerancia al estrés por Al.

Otro factor que aún no está claro como influye en la tolerancia al estrés por Al en centeno es el número de copias del gen *ScALMT1*. Collins et al (2008) han encontrado varias copias del gen *ScALMT1* en centeno, el cultivar tolerante (M39A-1-6) posee cinco copias en tándem y el sensible (M77A-1) dos copias. Tres de las copias, dos del cultivar tolerante (*ScALMT1-M39.1* y *ScALMT1-M39.2*) y otra del cultivar sensible (*ScALMT1-M77.1*) se expresan de forma muy intensa en los ápices de las raíces y se inducen por Al. También se han observado formas alternativas de procesamiento en dos de los genes de *ScALMT1*, estando en una de ellas correlacionada con una inserción de 400 pb en un intrón. Sin embargo, los resultados obtenidos por Fontecha et al. (2007) mediante Q-RT-PCR indican que el número de copias del gen *ScALMT1* es mayor en la línea consanguínea sensible Riodeva (entre cuatro y cinco copias) que en el cultivar tolerante Ailés (dos copias).

5.3. Identificación y caracterización de algunos genes involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos exudados en respuesta al estrés por Al y de genes implicados en el mantenimiento de la pared celular:-

Hemos aislado y caracterizado el ADNc en cuatro muestras de centeno (tres cultivares tolerantes y una línea consanguínea sensible) de los genes *ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS*, *ScFUM* y *ScPME*. También hemos obtenido el ADN genómico de varios de estos genes en el cultivar Ailés (*ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS* y *ScPME*).

A partir de las secuencias nucleótídicas hemos deducido la estructura en intrones y exones, hemos obtenido las proteínas hipotéticas codificadas por dichos genes, sus teóricas estructuras secundarias y terciarias y su teórica localización subcelular. También hemos averiguado el cromosoma o brazo cromosómico de centeno en el que se encuentran los genes identificados y hemos estudiado su variabilidad y sus relaciones filogenéticas.

Todos estos genes se han aislado y caracterizado en centeno siguiendo la misma metodología. A partir de secuencias de los genes deseados en otras especies de Poáceas, habitualmente cebada, arroz y maíz, se han diseñado parejas de “*primers*” específicos para cada gen en regiones conservadas y que nos permitieran amplificar la región codificante completa (ORF) a partir del ADNc procedente del ARNm. Por tanto, es muy importante estar seguros de que las secuencias obtenidas en centeno son realmente las ortólogas (equivalentes) a las secuencias empleadas para diseñar los “*primers*”.

Para estar seguros de que las secuencias obtenidas en centeno son las ortólogas de las secuencias empleadas para diseñar los “*primers*” hemos empleado distintos métodos. En primer lugar, hemos comparado las secuencias de centeno con la de las especies de procedencia, analizando la identidad nucleotídica. Además hemos comparado las secuencias de aminoácidos de las hipotéticas proteínas codificadas por los ADNc, estudiando la identidad y la similitud. En tercer lugar, hemos realizado estudios de relaciones filogenéticas y utilizado programas que permiten definir grupos de genes ortólogos. En todos los casos, para todos los genes, los valores de identidad nucleotídica, los valores de identidad y similitud de las secuencias de aminoácidos y las relaciones filogenéticas obtenidas indican que las secuencias aisladas y caracterizadas en centeno son las ortólogas de las secuencias utilizadas para diseñar los “*primers*”. En todos los dendrogramas obtenidos, ya sea con secuencias de nucleótidos de ADNc como con secuencias de aminoácidos, las secuencias aisladas en centeno agrupan en el mismo “*cluster*” que las secuencias empleadas para diseñar los “*primers*”. Además, la estructura en exones e intrones para los genes aislados coincide con la estructura esperada en la inmensa mayoría de los casos para los genes ortólogos en *B. distachyon*. En la Tabla 5.1 se resume la estructura en exones e intrones de los genes aislados.

Otro dato adicional que apoya el hecho de que las secuencias aisladas en centeno son las ortólogas de las utilizadas para el diseño de los “*primers*” es la localización cromosómica. Hemos averiguado el cromosoma o el brazo cromosómico en el que se encuentran los genes aislados en centeno. En la tabla 5.1 se puede ver un resumen de los datos de localización cromosómica. En todos los casos las localizaciones cromosómicas coinciden con lo esperado según las relaciones de sintenia entre *B. distachyon*, trigo, centeno, cebada y arroz. Las secuencias de Poáceas que agrupan en un mismo “*cluster*” además

se localizan en regiones cromosómicas equivalentes (sinténicas) en estas especies.

Tabla 5.1 Resumen de los resultados de caracterización, estructura en exones e intrones, localización cromosómica, comparación de identidades y similitudes, relaciones filogenéticas, estructuras proteicas secundarias y terciarias y localización subcelular. Las identidades nucleotídicas y de secuencias de aminoácidos están referidas en la mayoría de los casos a la secuencia de cebada de procedencia. Cada vez que aparece un SI en relaciones filogenéticas, significa que la secuencia de centeno está en el mismo “cluster” y en el mismo grupo de genes ortólogos que las secuencias de cebada, arroz o maíz utilizadas para diseñar los “primers”.

	ScMDH1	ScMDH2	ScCS	ScFUM	ScPME
Tamaño ORF	1029	1023	1419	1485	1692
Nº exones	7	7	19	17	2
Nº intrones	6	6	18	16	1
Identidad nucleotídica	95%	95%	95%	97%	96%
Localización cromosómica	1R	3RL	6RL	4R	2R
Identidad aa _s	95%	95%	99%	99%	95%
Similitud aa _s	95%	95%	99%	99%	95%
Hélice α	12	12	23	18	10
Lámina β	12	12	3	0	19
Estructura terciaria	1smkH	1smkH		3e04	1gq8
Localización subcelular	Mitocondri	Mitocondri	Mitocondri	Mitocondri	Soluble
	al	al	al	al	
R. filogenéticas ADNc	SI	SI	SI	SI	SI
R. filogenéticas proteínas	SI	SI	SI	SI	SI

Por ejemplo, los genes que codifican para las isoenzimas de MDH de comportamiento monomérico en centeno han sido localizados mediante el uso de líneas de adición trigo-centeno y mediante análisis de ligamiento en los cromosomas 1R y 3R (Salinas et al. 1984). Estos datos coinciden con la localización cromosómica de las secuencias de los ADNc de *ScMDH1* y *ScMDH2* en el cromosoma 1R y en el brazo 3RL, respectivamente. Además, una secuencia parcial de trigo que muestra una identidad nucleotídica muy elevada (superior al 95%) con la secuencia de *ScMDH2* de centeno se encuentra en los brazos largos de los cromosomas 3AL, 3BL y 3DL. Dichos brazos cromosómicos de trigo son equivalentes (sinténicos) al brazo 3RL de centeno. Las secuencias de arroz *Os05g0574400* y *Os01g0649100* ortólogas de *ScMDH1* y *ScMDH2* se encuentran en los cromosomas 5 y 1 de arroz que son en parte sinténicos de los cromosomas 1 y 3 de trigo respectivamente. Una situación semejante se obtiene para los demás genes localizados en centeno. Las localizaciones coinciden con las relaciones de sintenia conocidas.

Para no alargar de forma excesiva la discusión de este apartado de la tesis solamente se ha puesto el ejemplo de los genes de *ScMDH1* y *ScMDH2*.

En lo que respecta a la localización subcelular, lo esperado teniendo en cuenta las secuencias de procedencia de arroz y cebada (las utilizadas para diseñar los “*primers*”) era que todas las proteínas fueran de localización mitocondrial excepto la codificada por el gen *ScPME*. Todos los programas de predicción de localización subcelular a partir de la secuencia de aminoácidos indican que la localización subcelular más probable de todas las proteínas codificadas por los genes estudiados, excepto para la proteína *ScPME*, es mitocondrial (Tabla 4.14).

5.4. Análisis de la variabilidad de los genes estudiados en *Secale cereale* y en distintas especies de Poáceas:-

También hemos analizado la variabilidad dentro de *Secale cereale*, mediante la comparación de las secuencias de ADNc de los tres cultivares tolerantes y de la línea consanguínea sensible, y la variabilidad entre diferentes especies de Poáceas. En este último caso hemos comparado solamente secuencias ortólogas en las diferentes especies analizadas. Además, la variación se ha estudiado teniendo en cuenta el ADNc completo y también por exones.

En todos los genes aislados (*ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS*, *ScFUM* y *ScPME*) la diversidad nucleotídica y el resto de parámetros que estiman la variabilidad genética fue mayor siempre entre especies de Poáceas que entre muestras de la misma especie, en este caso, entre muestras de *Secale cereale*. La mayoría de los genes estudiados, son genes muy conservados durante la evolución, en especial los genes que codifican enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por tal motivo, el grado de conservación detectado entre especies de Poáceas es habitualmente bastante elevado, del 69% como mínimo o superior. Los genes que codifican para las enzimas del metabolismo básico de la célula han estado sujetos a presiones selectivas importantes y, por tal motivo, es difícil encontrar variantes que mejoren su actividad, en general la mayoría de los cambios detectados suelen o bien disminuir su eficacia o son simplemente neutros. Además, la mayoría de los cambios suelen producirse en regiones no involucradas en el centro activo del enzima. Naturalmente, el grado de conservación de las secuencias entre las muestras de centeno es muy superior siendo en todos casos analizados superior al 97%.

Los dos genes que codifican para las isoenzimas de málico deshidrogenasa mitocondrial (*ScMDH1* y *ScMDH2*) tienen tamaños parecidos (1029 y 1023 pb,

respectivamente). Sin embargo, el gen *ScMDH1* es mucho más diverso con 21 posiciones variables repartidas entre los siete exones (excepto en el exón 4 que es el más pequeño) que el gen *ScMDH2* con solo tres posiciones variables en el exón 7 (los demás exones no presentan SNPs). Esta diferencia también se pone de manifiesto cuando se observan los cambios sinónimos y no sinónimos en ambos genes. Ambos codifican para isoenzimas de MDH que poseen estructuras secundarias y terciarias muy semejantes y ninguna de las variantes observadas parece modificar dichas estructuras. Estos dos genes presentan una identidad en sus secuencias nucleótídicas y una identidad y similitud en sus secuencias de aminoácidos que son bastante elevadas y ambos codifican para málico deshidrogenasas mitocondriales con funciones totalmente semejantes. Estos genes, *ScMDH1* y *ScMDH2*, son genes parálogos que se han originado por duplicación antes de la aparición de las Poáceas, ya que se encuentran los dos genes en todas las especies de Poáceas estudiadas. Sin embargo, esta diferente variabilidad que se observa entre *ScMDH1* y *ScMDH2* entre las muestras de centeno no se mantiene cuando se comparan diferentes especies de Poáceas, la diversidad nucleotídica de ambos genes es semejante (Tabla 4.7) aunque ligeramente mayor en *MDH2*. Por tanto, esta gran diferencia en la variabilidad de *ScMDH1* y *ScMDH2* entre las muestras de centeno puede ser que se deba la bajo número de muestras analizadas, pero de no ser así, significaría que la mutación y la selección están afectando de forma distinta a cada uno de estos genes en centeno.

De todos los genes aislados en centeno, el más variable, el que posee una mayor diversidad nucleotídica es el *ScMDH1*.

Cuando se comparan distintas especies de Poáceas, en todos los genes estudiados, el número de cambios sinónimos es bastante mayor que el número de cambios no sinónimos. Sin embargo, cuando se comparan las muestras estudiadas en centeno, para algunos genes la situación se invierte, por ejemplo, el número de cambios no sinónimos es mayor que el de sinónimos en los genes *ScCS* y *ScFUM*.

5.5. Estudios de expresión de los mensajeros de los genes aislados:-

El estrés provoca cambios en la expresión de los genes y en la actividad de enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y en la cadena de transporte de electrones. En diferentes especies de microorganismos, animales y plantas se han descrito ejemplos de alteración de las enzimas que intervienen en el transporte de electrones mitocondrial por estrés con Al

(Efraín Ramírez Benítez et al 2008; Kumar et al 2008; Mailloux et al 2008). También se han descrito alteraciones metabólicas encaminadas a regular el ambiente redox celular, mantener la producción energética y aumentar la supervivencia del organismo frente a diferentes tipos de estrés: toxicidad por metales pesados, estrés hídrico y estrés oxidativo (Fedotcheva et al 2006; Mailloux et al 2007; Lemire et al 2008; Atkin y Macherel 2009).

Algunos autores creen que de las tres etapas que suelen distinguirse en el proceso de exudación de ácidos orgánicos, la etapa de síntesis y/o degradación de los ligandos del Al (el metabolismo de los ácidos orgánicos) es la menos factible de modificar (Hoekenga et al. 2011), siendo más fácil incidir en las etapas de percepción del Al y de exudación de los ácidos orgánicos. Como veremos más adelante, la sobre-expresión de algunos de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos, como citrato sintasa y malato deshidrogenasa ha dado lugar a resultados dispares en la misma especie y en diferentes especies.

En las especies vegetales en las que la exudación de ácidos orgánicos comienza inmediatamente después del tratamiento con Al (patrón tipo I) no se ha observado relación entre su exudación y los niveles internos de dichos ácidos. Los genotipos tolerantes y sensibles de trigo no difieren en las concentraciones internas de malato, sin embargo, los trigos tolerantes exudan 10 veces más malato que los sensibles (Delhaize et al. 1993). En maíz solamente los genotipos tolerantes muestran una exudación significativa de citrato, aunque los genotipos tolerantes y sensibles no se diferencian en las concentraciones internas de citrato en sus tejidos y el tratamiento con Al produce un igual aumento de la concentración de citrato en las raíces de ambos genotipos (Pellet et al. 1995). Estos resultados indican que no se conoce de forma suficiente la influencia del metabolismo de los ácidos orgánicos y su acumulación en las raíces en el estrés por Al.

En especies con patrón de tipo II, como la soja, en las que la exudación de citrato comienza después varias horas del comienzo del tratamiento con Al, la acumulación interna de citrato inducida por Al contribuye al incremento en la exudación de dicho ácido (Silva et al. 2001).

La mayoría de los estudios que abordan los cambios inducidos por el Al en enzimas del metabolismo de los ácidos orgánicos se han centrado en análisis de la actividad enzimática y, los resultados obtenidos son muy variados. Por ejemplo, en trigo las actividades enzimáticas de PEPC (Fosfoenol piruvato carboxilasa) y de malato deshidrogenasa (NAD-MDH) no se alteran por la

exudación de malato, de manera que no se observan diferencias significativas entre variedades tolerantes y sensibles (Ryan et al. 1995). En cambio, la actividad enzimática de citrato sintasa aumenta por estrés con Al en *Phaseolus vulgaris* (Mugai et al. 2000) y en *Cassia tora* (Yang et al. 2004). También aumenta la expresión génica y la actividad enzimática de la citrato sintasa mitocondrial en soja por estrés con Al (Eticha et al. 2010). En plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Koyama et al. 2000), alfalfa (Tesfaye et al. 2001) y canola (Anoop et al. 2003) la sobre-expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos orgánicos aumenta la tolerancia al estrés por Al y la exudación de los ácidos orgánicos.

En *Phaseolus vulgaris* el tratamiento con Al reduce la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) disminuyendo el consumo de citrato interno y aumentando su exudación (Rangel et al. 2010). La exudación continua de citrato, manteniendo la concentración normal en las raíces, requiere un aumento en la síntesis y/o reducción de su degradación. El mantenimiento de la exudación de citrato en judías no solamente necesita una reducción de la actividad de NADP-isocitrato deshidrogenasa, también es importante mantener las actividades de la citrato sintasa y de Fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) (Rangel et al. 2010). En los genotipos sensibles al aluminio de *Phaseolus vulgaris* el fallo en la exudación continua de citrato parece deberse principalmente a la menor actividad constitutiva de citrato sintasa (CS) que posteriormente se inhibe por tratamientos más prolongados con Al.

Por el contrario, otros investigadores (Ethica et al. 2010, Kumari et al. 2008) no han detectado cambios significativos para enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos. En particular, Kumari et al. (2008) en un análisis transcriptómico a gran escala mediante “microarrays” en *Arabidopsis*, solamente detectó cambios en la expresión de mensajeros de MDH entre un total de 52 genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

En trigo (patrón de exudación tipo I) la capacidad de síntesis de ácidos orgánicos no parece verse afectada por la exposición a Al ya que no se han detectado diferencias en las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, NAD-malato deshidrogenasa, citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente entre genotipos tolerantes y sensibles, tratados o sin tratar con Al. Sin embargo, en centeno (patrón de exudación tipo II) la actividad de la citrato sintasa de las raíces aumenta un 30% después del tratamiento con Al mientras que las actividades de fosfoenolpiruvato carboxilasa, NAD-malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente no parecen

estar afectadas. El aumento de actividad de citrato sintasa tiene lugar 6 horas después de la exposición a Al, justo antes del comienzo de la exudación de citrato por las raíces.

A pesar de que algunos autores creen que la etapa menos factible de modificar, de las tres que tienen lugar en el proceso de exudación de ácidos orgánicos por estrés con Al, es la de síntesis y/o degradación de los ligandos del Al (el metabolismo de los ácidos orgánicos), parece claro que deben producirse cambios en la regulación de los niveles internos de ácidos orgánicos como consecuencia del este tipo de estrés y, por tanto, la alteración del metabolismo de dichos ácidos, aunque compleja, puede contribuir de forma notable a la mejora de la tolerancia. Las plantas tolerantes de trigo exudan 10 veces más ácido málico que las sensibles en presencia de Al ¿Cómo es posible exudar 10 veces más que las sensibles sin que se agote el ácido málico?. Es posible que con estudios más metódicos y sistemáticos de las interacciones entre la síntesis de ácidos orgánicos, su exudación y la percepción de Al, puedan proponerse vías que nos indiquen de forma más clara como manipular y mejorar estos procesos para mejorar la tolerancia al estrés por Al.

Muchos de los trabajos de estrés por Al se han realizado estudiando la actividad enzimática y no la expresión de los genes que codifican para las enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos orgánicos. En estos estudios no suele distinguirse por separado la actividad procedente de las distintas formas moleculares (isoenzimas) citoplásmicas, mitocondriales o localizadas en otros compartimentos subcelulares. Es decir, se analiza la actividad enzimática global. Por consiguiente, los cambios detectados en la actividad enzimática no necesariamente van acompañados por variaciones en la abundancia de mensajeros de genes concretos. Para saber si se producen o no cambios en la expresión de genes concretos, en los niveles de los ARNm, creemos que el mejor sistema sería estudiar mediante Q-RT-PCR genes específicos relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos. Sin embargo, hay que tener claro que el que no se produzcan cambios en la expresión de un ARNm concreto no significa que dicho gen no esté involucrado en la tolerancia al estrés por Al. Baste recordar lo que sucede con el gen *TaALMT1* o con el gen *STOP1* cuya expresión no cambia por estrés con Al y, sin embargo, son dos genes candidatos de tolerancia con funciones muy importantes. Tampoco debemos pensar que si la expresión de un gen cambia como consecuencia del tratamiento con Al significa que se trata de un gen

involucrado en la tolerancia. Todos los tratamientos por estrés producen cambios en la expresión de cientos de genes, unos se inducen y otros se reprimen, pero solamente unos pocos o a veces solamente uno son los responsables de la mayoría de la tolerancia. También es importante no olvidar la variabilidad genética. Por ejemplo, un determinado alelo de un gen presente en un cultivar o en una especie puede producir o incrementar la tolerancia, mientras que otro alelo de ese mismo gen de otro cultivar o de otra especie distinta puede no contribuir a la tolerancia. El ejemplo más evidente es el gen *ALMT1* en trigo y en centeno. Los diferentes alelos de *ScALMT1* de centeno parecen conferir bastante tolerancia, sin embargo, en trigo muchos de los alelos de *TaALMT1* tienen una escasa contribución a la tolerancia. Una situación semejante se ha observado entre alelos del gen *ScMATE1* en centeno, algunos contribuyen a la tolerancia y otros no parecen contribuir o no ha sido posible detectar su contribución.

Para todos los genes aislados, excepto para *ScPME*, se estudio la expresión mediante Q-RT-PCR. En el caso de *ScPME* se intentó también llevar a cabo análisis de la expresión de su ARNm mediante Q-RT-PCR pero no fue posible obtener resultados claros ya que el número de ciclos (ct) necesarios para detectar el ARNm era bastante alto y se encontraba en el límite.

En primer lugar, creo que es importante recordar que los ARNm de los genes *ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS* y *ScFUM* se expresan en mayor cantidad en las raíces que en las hojas del cultivar tolerante y la línea sensible (Figura 4.30). Esta diferencia es más acusada en el cultivar tolerante Petkus sin Al (0 horas) y, solamente en el caso del gen *ScMDH1* con Al en la línea consanguínea Riodeva no aparecen diferencia significativas entre raíz y hoja.

Además, las raíces del cultivar tolerante Petkus, poseen mayor cantidad de ARNm de estos genes que las raíces de la línea sensible Riodeva, tanto en ausencia de aluminio como en su presencia, aunque la diferencia parece ser más acusada en ausencia de Al (Figura 4.31).

La cantidad relativa del ARNm de *ScMDH1* se reduce en las raíces del Petkus (tolerante) como consecuencia del tratamiento con Al alrededor de cuatro veces mientras que en Riodeva (sensible) se reduce aproximadamente a la mitad. Si tenemos en cuenta que en las raíces de Petkus sin Al hay 10 veces más ARNm de *ScMDH1* que en las raíces de Riodeva sin Al, una reducción de cuatro veces en Petkus significaría probablemente un aumento notable en la cantidad de málico en Petkus como consecuencia del tratamiento con Al, ya

que el malato no se transformaría en oxalato. Las raíces de la línea consanguínea Riodeva tienen 10 veces menos ARNm de *ScMDH1* que las raíces de Petkus sin Al y una reducción a la mitad por el tratamiento no supondría un aumento tan notable en la cantidad de málico. En el caso del ARNm de *ScMDH2* se observa una situación bastante semejante, aunque la cantidad de ARNm de *ScMDH2* en Petkus sin Al es solamente tres veces superior a la que hay en Riodeva sin Al. Como consecuencia del tratamiento con Al la cantidad del ARNm de *ScMDH2* se reduce aproximadamente tres veces en Petkus y en Riodeva. La consecuencia al final es semejante a la del caso de *ScMDH1*, en Petkus tendríamos una mayor cantidad de málico disponible para exudar. En cualquier caso, el comportamiento de ambos genes es similar pero no idéntico. Por tanto, en nuestro caso el estrés por Al parece reprimir los genes *ScMDH1* y *ScMDH2*, siendo el grado de represión diferente para ambos genes entre el cultivar tolerante y sensible y, esta represión podría estar relacionada con una mayor disponibilidad de málico en el cultivar tolerante. Por tanto, no creemos que una sobre-expresión de estos genes conduzca, al menos en centeno, a un aumento de la tolerancia. Incluso es probable que la sobre-expresión tuviera el efecto contrario, una disminución de la tolerancia. Por otro lado, tampoco pensamos que una sobre-expresión de estos genes tenga solamente efectos en la tolerancia al estrés por Al, de hecho, una excesiva producción de ácidos orgánicos, en todos los tejidos de una planta, probablemente origina más problemas que los que soluciona, ya que la regulación de los niveles de estos ácidos orgánicos está probablemente sujeta a mecanismos bastante finos de control. También, es importante destacar que es la primera vez que se describe en centeno una represión de dos genes que codifican para malato deshidrogenasa mitocondrial como consecuencia del tratamiento con Al. En trigo como ya hemos mencionado no se han detectado cambios significativos en la actividad enzimática de MDH ni tampoco en centeno. En centeno si se ha detectado un aumento de la actividad citrato sintasa como consecuencia del tratamiento con Al. Mediante “microarrays” en *Arabidopsis* no se han detectado cambios significativos como consecuencia del tratamiento por Al en la expresión en 52 genes relacionados con el TCA, excepto para uno de MDH. Ramírez-Benítez et al. (2008) en *Coffea arabica* han encontrado que la actividad enzimática de MDH y de CS se reprimen como consecuencia del tratamiento con Al.

Con respecto a citrato sintasa (CS) probablemente, un aumento de la actividad enzimática o de las cantidades de los ARNm de los genes que codifican para

CS podría conducir a un incremento en la cantidad de ácido cítrico que a su vez se traduciría en un aumento de la tolerancia al estrés por Al. Como hemos mencionado, en centeno se ha descrito un aumento de la actividad enzimática de CS como consecuencia del estrés por Al.

La citrato sintasa se ha sobre-expresado por diferentes investigadores (de la Fuente et al. 1997, Delhaize et al. 2001) en *Nicotiana* y los resultados obtenidos han sido contradictorios, en un caso se ha producido un aumento de la tolerancia al estrés por Al y en el otro no. En colza la sobre-expresión de malato deshidrogenasa y en alfalfa la sobre-expresión de citrato sintasa han producido un aumento de la tolerancia al estrés por Al (Tesfaye et al. 2001, Anoop et al. 2003). Pineiros et al. (2005) no han detectado cambios en la exudación de citrato que puedan relacionarse con diferentes niveles de tolerancia al estrés por Al. En cebada, la sobre-expresión del gen *TaALMT1* de trigo, puede interpretarse suponiendo que los cantidades internas de ácidos orgánicos no serían una limitación para la tolerancia al estrés por Al (Delhaize et al. 2004).

Los datos de expresión del ARNm de ScCS en centeno indican que la cantidad de este mensajero disminuye en las raíces del cultivar tolerante Petkus alrededor de cuatro veces como consecuencia del tratamiento, mientras que en la línea sensible la reducción no llega ni a la mitad. Además, la cantidad de ARNm de ScCS en las raíces de Petkus sin Al es aproximadamente siete veces superior a la presente en las raíces de Riodeva sin Al y en las raíces de Petkus hay como 50 veces más ARNm de ScCS que en las hojas. Por tanto, aunque el tratamiento con Al disminuye la cantidad del ARNm de ScCS en las raíces de Petkus de forma más intensa que en las raíces de Riodeva, a pesar de ello, después del tratamiento la cantidad del ARNm de ScCS es bastante mayor en el cultivar tolerante que en la línea sensible, del orden 3,4 veces más. Por consiguiente, el cultivar tolerante soportaría mejor el estrés por Al ya que podría producir, en principio, mayor cantidad de cítrico que la línea sensible. Por tanto, aunque se haya observado en centeno un aumento de la actividad enzimática de CS, este aumento no es posible atribuirlo a un gen concreto, y tampoco está claro si ese aumento se produce por un incremento en la cantidad del ARNm de un gen concreto. Es conveniente no olvidar que existen más genes que codifican para CS mitocondrial y para CS citosólicas que no hemos analizado en este trabajo y, que por supuesto, sería interesante estudiar. Por tanto, los resultados obtenidos en esta tesis, explican solamente una parte pequeña del metabolismo del ácido cítrico. En cualquier caso, al

igual que hemos visto con los genes que codifican para las dos isoenzimas de MDH mitocondrial estudiadas, el tratamiento con Al disminuye la expresión del ARNm del gen *ScCS*. Por tanto, teniendo en cuenta que la respuesta tanto del cultivar tolerante como de la línea sensible al estrés por Al es una represión o disminución de la cantidad del ARNm de *ScCS* más acusada en el cultivar tolerante, no parece claro que una sobre-expresión de este gen en centeno condujera a un aumento de la tolerancia.

Los resultados obtenidos con el ARNm del gen *ScFUM* son ligeramente distintos. En las raíces de Petkus (tolerante) la cantidad de mensajero se reduce alrededor de la mitad como consecuencia del tratamiento, pero en las raíces de la línea sensible (Riodeva) no se producen cambios significativos. La cantidad de ARNm de *ScFUM* en las raíces del cultivar tolerante es tres veces superior a la de las raíces de Riodeva sin Al y después del tratamiento con Al en Petkus hay 1,6 veces más ARNm de *ScFUM* que en Riodeva. La fumarasa hidrata el fumarato en malato, por tanto, una disminución de su actividad probablemente produciría una disminución de la cantidad de malato. Por tanto, el cultivar tolerante sin Al posee una mayor cantidad del ARNm de *ScFUM* que la línea sensible y tendría una mayor cantidad de málico y, aunque el tratamiento con Al reduce esta cantidad a la mitad en las raíces de Petkus, dicha cantidad sigue siendo mayor que en la línea sensible. En principio, una sobre-expresión del ARNm de *ScFUM* podría producir una mayor cantidad de malato y, por ende, podría mejorar la tolerancia. Sin embargo, no existen datos sobre los efectos de la sobre-expresión de este gen en el estrés por Al.

El último gen cuya expresión se ha estudiado mediante Q-RT-PCR semicuantitativa ha sido *ScPME*. En las raíces de Petkus hay una mayor cantidad de ARNm de *ScPME* que en las raíces de Riodeva sin Al, el tratamiento con Al inicialmente produce una disminución de la cantidad del ARNm de *ScPME* en Petkus y Riodeva, pero pasadas 24 horas en Petkus se ha producido una disminución de la cantidad y en Riodeva un aumento en comparación con la situación sin Al. Por tanto, el cultivar tolerante posee una mayor cantidad del ARNm del gen *ScPME* lo que significaría que tendría un mayor grado de metil-esterificación de las pectinas que producen una menor entrada del Al en la pared celular. Una situación semejante se ha observado en variedades tolerantes de maíz y trigo.

En maíz y trigo se han descrito variedades tolerantes al estrés por Al que muestran un elevado grado de metil-esterificación de la pectinas en las que se

produce una menor entrada de Al en la pared celular (Eticha et al. 2005, Yang et al. 2008). Estos resultados son bastante interesantes a pesar de la baja significación estadística (solamente se ha comparado una variedad sensible con otra tolerante en ambos trabajos) ya que coinciden en ambas especies.

Por tanto, en general el tratamiento con Al produce una disminución de las cantidades de los ARNm de los genes analizados en el cultivar tolerante y en la línea sensible, tanto de aquellos que están implicados en el metabolismo de los ácidos orgánicos (*ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS* y *ScFUM*) como de los involucrados en el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares (*ScPME*). Los resultados de expresión obtenidos pueden explicar en parte las diferencias entre el cultivar tolerante y línea sensible, ya que el cultivar tolerante podría disponer de una mayor cantidad de málico y cítrico en las raíces que la línea sensible. Además, estos resultados son novedosos ya que en centeno es la primera vez que se estudian los cambios en las cantidades de los mensajeros (cambios en la expresión) de genes involucrados en el metabolismo de ácidos orgánicos y, por tanto, es la primera vez que se describen variaciones en la expresión de estos genes. Está claro que la tolerancia al estrés por Al en centeno es un carácter cuantitativo en el que influyen muchos loci (*Alt1*, *Alt2*, *Alt3*, *Alt4*, *Alt5*, etc.) situados en diferentes cromosomas. Hasta la fecha los genes candidatos identificados en centeno son transportadores de malato y de citrato activados por Al (*ScALMT1* y *SCMATE1*) y en otras especies, además se han identificado factores de transcripción necesarios para la expresión de los transportadores de malato y citrato, como el gen *STOP*. Los datos obtenidos en nuestro trabajo indican que los genes analizados también pueden contribuir a la tolerancia.

Todavía queda una enorme cantidad de trabajo por realizar en el campo de la tolerancia al estrés por Al en plantas, con respecto a los genes analizados en este trabajo en el futuro se analizará la implicación de estos genes en la tolerancia al estrés por Al en especies modelo como *A. thaliana* y *B. distachyon*. Para ello se estudiarán mutantes de inserción de T-DNA en *Arabidopsis* en los que los no funcionen los genes analizados (mutantes “*konck-out*”) y obtendremos plantas transgénicas con los genes de centeno.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- Los cultivares estudiados se clasificaron en muy tolerantes, moderadamente tolerantes y sensibles mediante dos parámetros (RRS y RRL) basados en el crecimiento de las raíces después del tratamiento con Al y mediante tinciones con hematoxilina. El grado de correlación entre los distintos métodos utilizados para estimar la tolerancia fue muy elevado.
- 2.- Los cultivares muy tolerantes y los sensibles también fueron evaluados mediante tinciones con Morín, reactivo de Schiff y DCF-DA. Los resultados obtenidos indican que los cultivares tolerantes acumulan menos aluminio en las raíces y resisten mejor el estrés oxidativo (menor peroxidación lipídica y menor producción de H_2O_2) que los sensibles.
- 3.- No se ha encontrado relación entre el nivel de tolerancia de los cultivares analizados y la variabilidad de las secuencias de nucleótidos de la región promotora del gen *ScALMT1* estudiada, ni de los exones 1 y 6, ni del intrón 5.
- 4.- Se han aislado, caracterizado y localizado cromosómicamente dos genes de málico deshidrogenasa (*ScMDH1* y *ScMDH2*), un gen de citrato sintasa (*ScCS*), otro de fumarasa (*ScFUM*) y uno de pectin metilesterasa (*ScPME*) que se encuentran en los cromosomas 1R, 3RL, 6RL, 4R y 2R, respectivamente. Los resultados de localización cromosómica coinciden con los esperados teniendo en cuenta las relaciones de sintenia entre *B. distachyon*, arroz, trigo, cebada y centeno y con las relaciones filogenéticas obtenidas.
- 5.- Se han obtenido las proteínas hipotéticas codificadas por dichos genes y mediante diferentes programas informáticos se han conseguido las teóricas estructuras secundarias y terciarias correspondientes. En todos los casos, son muy semejantes o casi idénticas a las descritas para las proteínas ortólogas de otras especies de Poáceas. También, se han empleado programas que predicen la localización subcelular más probable de las proteínas, encontrando que las proteínas MDH1, MDH2, CS y FUM de centeno son mitocondriales, mientras que PME es una proteína soluble.
- 6.- Se ha estudiado la variabilidad de los ADNc completos y por exones de estos genes (*ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS*, *ScFUM* y *ScPME*) en tres cultivares tolerantes de centeno y una línea consanguínea sensible. También se ha analizado la diversidad de los mismos genes entre diferentes especies de Poáceas y se han construido árboles filogenéticos con secuencias de nucleótidos y con secuencias de proteínas. En todos los casos se ha

encontrado una mayor variación (diversidad nucleotídica) entre diferentes especies de Poáceas que entre cultivares o líneas de centeno. El número de cambios sinónimos fue siempre mayor que el de no sinónimos, salvo alguna excepción entre cultivares y líneas de centeno que puede ser debida al azar. Los dendrogramas obtenidos en todos los casos agrupan las secuencias de centeno en el mismo *cluster* que las secuencias equivalentes (ortólogas) de otras especies de Poáceas. Estos resultados indican que hemos aislado en centeno las secuencias ortólogas a las deseadas. Igualmente, los dendrogramas obtenidos apoyan los datos de localización cromosómica y sintenia.

7.- Los resultados de los estudios de expresión de los ARN mensajeros de los genes de *ScMDH1*, *ScMDH2*, *ScCS* y *ScFUM* indican que estos genes se expresan de forma más intensa en las raíces que en las hojas. En todos los casos, la cantidad de los ARN mensajeros es mayor en las raíces del cultivar tolerante que en la línea sensible en los tratamientos sin Al y con Al. El tratamiento con Al produce habitualmente una disminución en la cantidad de los ARN mensajeros (represión) de estos genes de distinta intensidad en el cultivar tolerante que en la línea sensible. Los cambios en la expresión explican en parte el mayor grado de tolerancia del cultivar Petkus, ya que pueden conducir a un mayor contenido del málico y cítrico disponibles para exudar.

8.- Los cambios en la expresión de los ARN mensajeros del gen *ScPME* como consecuencia del tratamiento con Al son diferentes en las raíces del cultivar tolerante, en las que se produce una represión, que en las raíces de la línea sensible, en las que parece tener lugar una inducción. La cantidad de ARN mensajero de este gen es mayor en las raíces del cultivar tolerante que en las raíces de la línea sensible sin Al, pudiendo estar relacionada esta diferencia con la mayor acumulación de Al que se produce en las raíces de la línea sensible. En las hojas no se ha detectado el ARN mensajero del gen *ScPME*.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adams, F.** (1984). Crop response to lime in the southern United States. In: Soil acidity and liming. Adams, F. (ed.). American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. pp. 211-265.
- Akhavan, A., Saeidi, H. and Rahiminejad, R.M.** (2009). Genetic diversity of *Secale cereale* L. in Iran as measures using microsatellites. Genet Resour Crop Evol. DOI 10.1007/s10722-009-9480-9.
- Allison M. Krill1, Matias Kirst, Leon V. Kochian, Edward S. Buckler, Owen A. Hoekenga.** (2010). Association and Linkage Analysis of Aluminum Tolerance Genes in Maize. PLoS ONE 5(4): 1-11.
- Almeida, L.A.V.** (1955). A material orgânica e a calagem na fertilização da terra. Boletim Ordem Engenheiros 4:1-16.
- Al-Qsous, .** (2004). Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. Planta 219, 369-378.
- Aniol, A., Hill R.D., Larter, E.N.** (1980). Aluminum tolerance of spring rye inbred lines. Crop. Sci. 20: 205-208.
- Aniol, A.** (1984a). Introduction of aluminum tolerance into aluminum sensitive wheat cultivars. Z. Pflanzenzuchtg. 93:331-339.
- Aniol, A.** (1984b). Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. Plant Physiol. 75:551-555.
- Aniol, A.** (1990). Genetics of tolerance to aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). Plant and Soil 123:223:227.
- Aniol, A., and L. Madej.** (1996). Genetic variation for aluminum tolerance in rye. Vortr. Pflanzenz, chtg. 35:201-211.
- Aniol, A.** (2004). Chromosomal location of aluminium tolerance genes in rye. Plant Breeding 123(2):132-136.
- Anoop V.M., Basu U., McCammon M.T., McAlister-Henn L., Taylor G.J.** (2003). Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing mitochondrial citrate synthase. Plant Physiol 132: 2205-2217.
- Arancibia, R.A. and Motsenbocker, C.E.** (2006). Pectin methylesterase activity in vivo differs from activity in vitro and enhances polygalacturonase-mediated pectin degradation in tabasco pepper. J. Plant Physiol. 163:488-496.
- Atkin O.K., Macherel D.** (2009) .The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. Ann Bot (Lond) 103:581-597.
- Baier, A.C., Somers, D.J., Gustafson, J.P.** (1995). Aluminum tolerance in wheat: Correlating hydroponic evaluation with field and soil performances. Plant Breeding 114:291-296.

- Baier, A.C., Somers, D.J., Gustafson, J.P.** (1996). Aluminum tolerance in Triticale, wheat and rye. In: *Triticale Today and Tomorrow*, Kluwer Academic Publishers. pp. 437-444.
- Bajic V.B., S.H. Seah, A. Chong, G. Zhang, J.L.Y. Koh, and V. Brusic.** (2002). Dragon Promoter Finder: recognition of vertebrate RNA Polymerase II promoters. *Bioinformatics*, 18: 198-199.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L. and Servillo, L.**(1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in Kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *European Journal of Biochemistry*. 193:183–187.
- Barber, S.A.** (1984). Liming materials and practices. In: *Soil acidity and liming*. Adams, F. (*ed.*). American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. pp. 171-209.
- Barkworth, M.E. and von Bothmer, R.** (2009). Scientific Names in *Triticeae*. Em: Feuillet, C. e Muchlbauer, G. J. ed., *Genetics and Genomics of the Triticeae*, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. 7 pp. 3-4.
- Barone, P.D., Rosellini, P. LaFayette, J. Bouton, F. Veronesi and W. Parrott.** (2008). Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Rep.* 27:893–901.
- Basu, A., Basu, U., Taylor, G.J.** (1994a). Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol.* 104:1007-1013.
- Basu, U., Godbold, D., Taylor, G.J.**(1994b). Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *Plant Physiol.* 144:747-753.
- Basu, U., McDonald, J.L., Archambault, D.J., Good, A.G., Briggs, K.G., Aung, T., Taylor, G.J.** (1997). Genetic and physiological analysis of doubled-haploid, aluminium-resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 kD, root exudate polypeptide in mediating resistance. *Plant and Soil* 196:283-288.
- Begum, H. H., Mitsuru, O., Toshihiro, W., Takuro, S.**(2009). Mechanisms of Aluminum Tolerance in Phosphoenolpyruvate Carboxylase Transgenic Rice. *J. of Plant Nutrition* 32(1):84-96.
- Benito C., Silva-Navas J., Fontecha G., Hernández-Riquer M.V., Eguren M., Salvador N., Gallego F.J.**(2010) From the rye *Alt3* and *Alt4* aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals. *Plant Soil*, 327:107-120.
- Benkert, P., Tosatto S.C., Schomburg D.** (2008) a comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins Sci.* 71(1):261-77.
- Bennet, R.J., Breen, C.M.** (1991). The aluminum signal: New dimensions to mechanisms of aluminum tolerance. *Plant and Soil* 134:153-166.

- Bennett M.D., Smith J.B.**(1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol. Sci.*, 274:227-274.
- Berzonsky, W.A.** (1992). The genomic inheritance of aluminum tolerance in ‘Atlas 66’ wheat. *Genome* 35:689-693.
- Björn, W., and Arne, E.** (2006) Identification of correct regions in protein models using structural, alignment, and consensus information. *Protein*. 15(4): 900–913.
- Bogouszewski, W.** (1980). Plant adaptation to acid, aluminium–toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analyses*, 19(7-12), 959-987.
- Blamey, F.P.C., Edmeades, D.C., Wheeler, D.M.** (1990). Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of *Lotus* species. *J. Plant Nutr.* 13:729-744.
- Bolibok, H., Rakoczy-Trojanowska, M., Hromada, A. and Pietrzykowsky, R.** (2005). Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereale L.*) inbred lines. *Euphytica* 146:109-116.
- Bondia-Pons, I., Aura, A.M., Vuorel, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H. and Poutanen, K.** (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *J.of Cereal Science* 49: 323-336.
- Bosch, M. and Hepler, P.K.** (2005) .Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tube. *Plant Cell* 17, 3219–3226.
- Bot A.J., Nachtergaele F.O., Young A.** (eds) (2000). Land resource potential and constraints at regional and country level. F.A.O. Land and Water Development Division, FAO, Rome.
- Bourlaug, N.E., Dowswell, C.R.** (1997). The acid lands: One of agriculture’s last frontiers. In: *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Brazilian Soil Science Society. 5-15.
- Brondani, C., Paiva, E.** (1996). Análise de RFLP da tolerancia a toxidez do aluminio no cromosoma 2 do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (31):575-579,.
- Brosché, M., Åke S.**(1999). Cloning, Expression, and Molecular Characterization of a Small Pea Gene Family Regulated by Low Levels of Ultraviolet B Radiation and Other Stresses. *Plant Physiology* 121 (2): 479-488.
- Brummell, D.A.** (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55, 2029–2039.
- Bushuk, W.** (2001). Rye Production and Uses Worldwide. *Cereal Foods World* 46 (2): 70-73.
- Camargo, C.E.O.** (1981). Wheat improvement. I. The heritability of tolerance to aluminum toxicity. *Bragantia* 40:33-45 (*in Portuguese*).
- Camargo, C.E.O.** (1984). Wheat improvement. VI. Heritability studies on aluminum tolerance using three concentrations of aluminum in nutrient solutions. *Bragantia* 44:49-64 (*in Portuguese*).

- Campbell, L.G., Lafever, H.N.** (1981). Heritability of aluminum tolerance in wheat. *Cereal Res. Common.* 9:281-287.
- Caniato F.F., Guimaraes C.T., Schaffert R.E., Alves V.M., Kochian L.V., Borem A., Klein P.E., Magalhaes J.V.** (2007). Genetic diversity for aluminum tolerance in *sorghum*. *Theor. Appl. Genetic* 114: 863–876.
- Claros M.G., and G. von Heijne.** (1994). An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS* 10: 685-686.
- Carver, B.F., Ownby, J.D.** (1995). Acid Soil Tolerance in Wheat. *Advances in Agronomy* 54:117-173.
- Carver, B.F., Inskeep, W.P., Wilson, N.P., Westerman, R.L.** (1988). Seedling tolerance to aluminum toxicity in hard red winter wheat germplasm. *Crop Sci.* 28:463-467.
- Cserzo M., F. Eisenhaber, B. Eisenhaber and I. Simon.** (2002). on filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng.* 15: 745-752.
- Chikmawati, T., Skovmand, B. and Gustafson, J.P.** (2005). Phylogenetic relationships among *Secale* species revealed by amplified fragment length polymorphisms. *Genome* 48: 792-801.
- Chikmawati, T., Ma, X.F., Ross, K., Miftahudin, H. and Gustafson, J.P.** (2006). The genus *Secale*. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (1):243-255.
- Collins N.C., Shirley N.J., Saeed M., Pallotta M., Gustafson J.P.** (2008). An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* 179, 669–692.
- Conner, A.J., Meredith, C.P.** (1985). Large scale selection of aluminum-resistant mutants from plant cell culture expression and inheritance in seedlings. *Theor. Appl. Genetic* 71:159-165.
- Cosgrove D.J.** (2000) New genes and new biological roles for expansins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:73–78.
- Cosgrove D.J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 850–861.
- Coutinho, P.M.** (2003). Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? *Trends Plant Sci.* 8, 563–565.
- Cruz-Ortega, R., Cushman, J.C., Ownby, J.** (1997). cDNA clones encoding 1,3-beta-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.* 114: 1453-1460.
- Cuadrado, A. and Jouve, N.** (1997). Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Genome* 40: 309-317.

- Cuadrado, A. and Jouve, N.** (2002). Evolutionary Trends of Different Repetitive DNA Sequences During Speciation in the Genus *Secale*. The American Genetic Association 93: 339-345.
- David E., Roland L., James U. Bowie.** (1997) Assessment of protein models with three-dimensional profiles Methods in Enzymology V.277, P.396–404
- De Bustos, A. and Jouve, N.** (2002). Phylogenetic relationship of genus *Secale* based on the characterization of rDNA ITS sequences. Plant Systematics and Evolution 235: 147-154.
- Dedio, W., Kaltsikes, P.J. and Larter, E.N.** (1969). Numerical chemotaxonomy in the genus *Secale*. Canadian J. of Botany 47: 1175-1180.
- Del Pozo, J.C., Figueiras, A.M., Benito, C. and De la Pena, A.** (1995). PCR derived molecular markers and phylogenetic relationships in *Secale* genus. Biol. Plant 37: 481-489.
- Delhaize, E., Higgins, T.J.V., Randall, P.J.** (1991). Aluminum tolerance in wheat: Analysis of polypeptides in the root apices of tolerant and sensitive genotypes. Kluwer Academic Publishers.1071-1079.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Randall, P.J.** (1993). Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.). II: Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices. Plant Physiol. 103:695-702.
- Delhaize, E., Hebb, D.M., Richards K.D., Lin J.M., Ryan P.R., Gardner, C.** (1999). Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. J. Biol. Chemistry 274(11): 7082-7088.
- Delhaize, E., Hebb, D.M., Ryan, P. R.** (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* Citrate Synthase Gene in Tobacco Is Not Associated with Either Enhanced Citrate Accumulation or Efflux. Plant Physiol. 125: 2059-2067.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Hebb, D.M., Yamamoto, Sasaki, T., Matsumoto, H.** (2004). Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(42): 15249-15254.
- Delhaize, E; Gruber, B.D., Ryan, P.R.** (2007). The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition". FEBS Letters 581: 2255-2262.
- De la Fuente, J.M.** (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276:1566–1568
- Derbyshire P., McCann M., Roberts K.** (2007). Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. BMC Plant Biology 7: 31–42.

- Devos, K.M., Atkinson, M.D., Chinoy, C.N., Francis, H.A., Harcourt, R.L., Koebner, R.M.D., Liu, C.J., Masojc, P., Xie, D.X. and Gale, M.D.** (1993). Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genetic* 85:673–680.
- Devos, K.M., Gale, M.D.** (2000). Genome relationships: The grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637-646.
- De la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L.** (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.
- Dolezel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak MA, Nardi L., Obermayer R.** (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82 (Suppl. A):17-26.
- Dong DF, Li Y.R., Jiang L.G.** (2008). Effects of brassinosteroid on photosynthetic characteristics in soybean under aluminum stress. *Acta Agron. Sin.* 34: 1673-1678.
- Douce R., Neuburger M.** (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 40: 371-414.
- Duncan R. R., Sutton J. D. and Dominy R. E.** (1983). Leaf mineral element concentrations and growth of sweet *sorghum* subject to acid soil stress. *J. Plant Nutr.* 6, 781-799.
- Duncan, R. R.,** (1988). Sequential development of acid soil tolerant *sorghum* genotypes under field stress conditions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 1295–1305.
- Durrett T.P., Gassmann W., Rogers E.E.** (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology* 144: 197–205.
- Efraín Ramírez-Benítez J, Chee-González L, Teresa Hernandez-Sotomayor SM** (2008) Aluminium induces changes in organic acids metabolism in *Coffea arabica* suspension cells with differential Al-tolerance. *J. of Inorganic Biochemistry* 102, 1631–1637. doi:10.1016/j.jinorgbio. 2008.03.002
- Eriksson, E.M.** (2004). Effect of the Colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiol.* 136, 4184 – 4197.
- Ermolayev, V., Weschke, W., Manteuffel, R.** (2003). Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *J. Exp. Bot.* 54(393): 2745-2756.
- Eswaran, H., Reich, P., Beinroth, F.** (1997). Global distribution of soils with acidity. In: *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Brazilian Soil Science Society. pp. 159-164.
- Eticha D., Stass A., Horst W.J.** (2005). Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell & Environment* 28: 1410–1420.

- Eticha D., Marc Zahn, Melanie Bremer, Zhongbao Yang, Andre´s F. Rangel, Idupulapati M. Rao, Walter J. Horst** (2010). Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Ann. of Botany* 105: 1119–1128.
- Ezaki B, Tsugita, S., Matsumoto, H.** (1996). Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminium treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminium stress. *Physiol. Plant* 96: 21-28.
- Ezaki B, Yamamoto Y. and Matsumoto H.** (1995). Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol Plant* 93: 11-18.
- Ezaki B., Kiyohara H., Matsumoto H., Nakashima S.** (2007) Overexpression of an auxilin-like gene (F9E10.5) can suppress Al uptake in roots of *Arabidopsis*. *J. Exp Bot* 58: 497–506
- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M., Robinson, N.J.** (1992). Expression of the pea metallothionein-like gene PsMTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PsMTA function. *Plant Mol. Biol.* 20: 1019–1028.
- Fedotcheva N.I., Sokolov A.P., Kondrashova M.N.** (2006) Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* (41):56–64. doi:10.1016/j.freeradbiomed. 2006.02.012
- Ferrándiz, C.** (2002). Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 53, 2031–2038.
- FitzPatrick, E.A.** (1986). An introduction to soil science. Longman Scientific & Technical. 2-55.
- Flavell R.B., Bennett M.D., Smith J.B., Smith D.B.** (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genet*, 12:257-269.
- Fontecha, G., Silva-Navas, J., Benito, C., Mestres, M.A., Espino, F.J., Hernández-Riquer, M.V. Gallego, F.J.** (2007). Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the Alt4 locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 114: 249-260.
- Francis, K.E.** (2006) Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiol.* 142:1004–1013.
- Frederiksen, S. and Petersen, G.** (1997). Morphometrical analyses of *Secale* (*Triticeae*, *Poaceae*). *Nordic Journal Botany* 17:185-197.
- Frederiksen, S. and Petersen, G.** (1998). A taxonomic revision of the genus *Secale* (*Triticeae*; *Poaceae*). *Nordic Journal Botany* 18: 399-420.
- Fontecha, G., Silva-Navas, J., Benito, C., Mestres, M.A., Espino, F.J., Hernández-Riquer, M.V. and Gallego, F.J.** (2007). Candidate gene identification of an aluminum-activated organic

- acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). Theoretical and Applied Genetics, (114), no. 2, :249-260.
- Foy, C.D.** (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. In: Soil Acidity and Liming. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. pp. 57-97.
- Foy, C. D.** (1988). Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 19:959-987.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C.** (1978). The physiology of metal toxicity in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 29:511-566.
- Foy, C.D., Armiger, W.H., Briggles, L.W., Reid, D.A.** (1965). Differential aluminum tolerance of wheat and barley varieties in acid soils. Agro. J. 57:413-417.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K., Ma, J.J.** (2007). An aluminum-Activated citrate transporter in Barley. Plant Cell Physiol. 48(8): 1081-1091.
- Gallego, F.G., Benito, C.** (1997). Genetic control of aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 95:393-399.
- Gallego, F.J., López-Solanilla, E., Figueiras, A.M., Benito, C.** (1998a). Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminium tolerance genes in rye. Theor. Appl. Genet. 96: 426-434.
- Gallego, F.J., Calles, B., Benito, C.** (1998b). Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene Alt1 in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 97: 1104-1109.
- Gonçalves J. F.C. , José C., Paulo R. M., Elza F. A.** (2005). Aluminum Effect on Organic Acid Production and Accumulation in *Sorghum*. Journal of Plant Nutrition 28 (3): 507-520.
- Goodenough, P, Carter, C.E.** (2000). The structure of pectin methylesterase: the relevance of parallel b helix proteins to xylem differentiation. In Cell and Molecular Biology of Wood Formation 305-314, BIOS Scientific
- Grsic-Rausch, S., and Rausch, T.** (2004). A coupled spectrophotometric enzyme assay for the determination of pectin methylesterase activity and its inhibition by proteinaceous inhibitors. Anal. Biochem. 133, 14-18.
- Guedes-Pinto, H.** (1985). Novas técnicas para o melhoramento de cereais tolerantes ao alumínio. Workshop "Inovacao tecnológica e desenvolvimento regional". Universidades do Minho. Braga pp 11.
- Guo, P.; Bai, G.; Carver, B.; Li, R.; Bernardo, A. and Baum, M.** (2007). Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. Molecular Genetics and Genomics. (277) no. 1, p. 1-12.

- Guo, T.R.** (2007). Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam, (57)n.2, p.182-188,.
- Gustafson, J.P., Ross, K.** (1990). Control of alien gene expression for aluminum tolerance in wheat. *Genome* 33:9-12. Haug, A. 1983. Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 1:345-373.
- Hamel, F., Breton, C., Houde, M.** (1998). Isolation and characterization of wheat aluminium-regulated genes: possible involvement of aluminium as a pathogenesis response elicitor. *Planta* 205: 531-538.
- Hamilton, C. A., Good, A. G., Taylor, J.G.**(2001). Induction of vacuolar *ATPase* and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol.* 125(4): 2068-2077.
- Han Y, Zhang J, Chen X, Gao Z, Xuan W, Xu S, Ding X, Shen W** (2008) Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa*. *New Phytol* 177: 155–166
- Hancock, J.F.** (2004). *Plant evolution and the origin of crop species*. 2nd edition. CABI Publishing, Cambridge, USA, pp. 187-188.
- Hasunuma, T.** (2004). Expression of a fungal pectin methylesterase in transgenic tobacco leads to alteration in cell wall metabolism and a dwarf phenotype. *J. Biotechnol.* 111, 241–251.
- Haug, A.** (1983). Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 1:345-373.
- Hede, A.R., Skovmand, B., López-Cesati, J.** (2001). Acid Soil and Aluminum Toxicity. In: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI, MacNab A (*eds*) *Application of physiology in wheat breeding*. DF: CYMMYT, Mexico, pp 172–182.
- Henderson, M., Ownby, J.D.** (1991). The role of root cap mucilage secretion in aluminum tolerance in wheat. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 10:134-141.
- Herrera-Estrella, L.** (1999). transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5978-5981
- Hoekenga, O. A., Maron, L. G., Piñeros, M.A., Cançado, G.M.A., Shaff, J., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., Sasaki, T., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Koyama, H., Kochian, L.V.** (2006). *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103(25): 9738-9743.
- Hoekenga, O. A., Vision, T. J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., Lee, G.P., Howell, S.H., Kochian, L.V.** (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis*

- (*Landsberg erecta* \times *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* 132(2): 936-948.
- Hoekenga O.A., Magalhaes J.V.** (2011). Mechanisms of Aluminum Tolerance. *Root Genomics*, Costa de Oliveira A and Varshney RK(eds.). pp. 133-153.
- Horst, W.J.**(1995). The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: A review. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 158:419-428.
- Horst, W.J., Pschel, A.K., Schmohl, N.** (1997). Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant and Soil* 192:23-30.
- Horst, W.J., Wagner, A., Marshner, H.** (1982). Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105:435-444.
- Huang C.F., Yamaji N., Mitani N., Yano M., Nagamura Y, Ma J.F.** (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21: 655-667
- Hue, N.Y., Craddock, G.R., Adams, F.** (1986). Effect of organic acids on aluminium toxicity in subsoils. *Soil Sci. Society of America J.* 50:28-34.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton.** (1996). a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci.* 5(2): 212-220.
- Ikka T, Kobayashi Y, Iuchi S, Sakurai N, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H** (2007) .Natural variation of *Arabidopsis thaliana* reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. *Theor. Appl. Genetic* 115: 709-719.
- Ishikawa S., Wagatsuma T., Sasaki R. and Ofei-Manu P.** (2000). Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. *Soil Science and Plant Nutrition* 46:751-758.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., and Kobayashi, M.** (2007). Zinc finger protein *STOP1* is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 9900-9905.
- Jayasundara, H.P.S., Thomson ,B.D., Tang, C.** (1998). Responses of cool season grain legumes to soil abiotic stresses. *Advances in Agronomy* 63:77-151.
- Jemo, M.** (2007). Aluminum resistance of cowpea as affected by phosphorus-deficiency stress. *Journal of Plant Physiology, Stuttgart*, v.164, n.4, p.442-451,
- Jiang, L.** (2005). *VANGUARD1* encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell* 17, 584-596.
- Johnson, J.P., Carver, B.F., Baligar, V.C.** (1997). Productivity in Great Plains acid soils of wheat genotypes selected for aluminium tolerance. *Plant and Soil* 188:101-106.

- Jones D.T.** (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 292: 195-202.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S.** (2006). Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callosa production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ* 29: 1309-1318.
- Kavanagh, K.L., Picaud, S., Pilka, E.S., Yue, W.W., Roos, A.K., Filippakopoulos, P., Vondelft, F., Arrowsmith, C.H., Wikstrom, M., Edwards, A.M., Bountra, C., Oppermann, U.,** Structural Genomics Consortium, *Journal: To Be Published.*
- Kennedy, I.R.** (1986). Acid soil and acid rain: the impact on the environment of nitrogen and sulphur cycling. Research Studies Press, Letchworth, UK.
- Kerridge, P.C., Kronstad, W.E.** (1968). Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill., *Host.*). *Agron. J.* 60:710-711.
- Khush, G.S.** (1962). Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*, II. Interrelationships in the wild species. *Evolution* 16: 484-496.
- Khush, G.S.** (1963). Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*, IV. *Secale vavilovii* and its biosystematic status. *Z. Pflanzenzücht* 50: 34-43.
- Khush, G.S. and Stebbins, G.L.** (1961). Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*, I. Some new data on the ancestry of *S. cereale*. *Am. J. Bot.* 48: 723-730.
- Kidd P.S., Lluogan M., Poschhenrieder C., Gunsė B., Barceló J.** (2001). The role of root exudates in aluminum resistance and silicon induced amelioration of aluminum toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Exp. Bot.* 52(359): 1339-1352.
- Kihara T., Ohno T., Koyama H., Sawafuji T., Hara T.** (2003). Characterization of NADP-isocitrate dehydrogenase expression in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. *Plant and Soil* 248: 145-153.
- Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J., Harter K.** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* 50:347-363.
- Kobayashi Y., Koyama H.** (2002). *QTL* analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 1526-1533.
- Kobayashi, Y., Furuta, Y., Ohno, T., Hara, T., Koyama, H.** (2005). Quantitative trait loci controlling aluminium tolerance in tall accessions of *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta and Cape Verde Islands). *Plant Cell Environment* 28: 1516-1524.
- Kobayashi Y., Hoekenga O.A., Itoh H., Nakashima M., Saito S., Shaff J.E., Maron L.G., Pineros M.A., Kochian L.V., Koyama H.** (2007) .Characterization of *AtALMT1* expression

- in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 843–852.
- Kochian, L.V.** (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:237–260.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A.** (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 55:459–493.
- Kondrakhin Y.V., A.E. Kel, N.A. Kolchanov, A.G. Romashchenko, and L. Milanesi.** (1995). Eukaryotic promoter recognition by binding sites for transcription factors. *Comput Appl Biosci.* 11: 477–488.
- Kovermann, P., Meyer, S., Hoërtensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y., and Martinoia, E.** (2007). The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the *ALMT* family. *Plant J.* 52, 1169–1180.
- Koyama, H., Takita, E., Kawamura, A., Hara, T. and Shibata, D.** (1999). Overexpression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol.* 40: 482–488.
- Koyama H., Kawamura A., Kihara T., Hara T., Takita E., Shibata D.** (2000). Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant and Cell Physiology* 41: 1030–1037.
- Krogh A., B. Larsson, G. von Heijne and ELL Sonnhammer.** (2001). Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J. Mol Biol.* 305: 567–580.
- Kumar V., Bal A., Gill K.D.** (2008) Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Research* 1232, 94–103. doi:10.1016/j.brainres. 2008.07.028
- Kumari M., Taylor G.J., Deyholos M.K.** (2008). Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 279: 339–357.
- Lafever, H.N., Campbell, L.G.** (1978). Inheritance of aluminum tolerance in wheat. *Can. J. Gen. Cytol.* 20:355–364.
- Langer, R.M.M. and Hill, G.D.** (1991). *Agricultural Plants*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 40–77.
- Larsen, P.B., Tai, C.Y., Kochian, L.V., Howell, S.H.** (1996). *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminium. *Plant Physiol.* 110: 743–751.

- Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C.Y., Stenzler, L.M., Howell, S.H., Kochian, L.V.** (1998). Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminium accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* 117(1): 9-18.
- Larsen, P.B., Geisler, M.J.B., Jones, C.A., Williams, K.M., Cancel, J.D.** (2005). ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41, 353–363.
- Larsen, P.B., Cancel, J., Rounds, M., Ochoa, V.** (2007). *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta*, in press, doi: 10.1007/s00425-006-0452-4.
- Laskowski R.A., Rullmannn J.A., MacArthur M.W., Kaptein R., Thornton J.M.** (1996) programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J.Biomol NMR.* 8(4):477-86.
- Lazof, D.B., Goldsmith, J.G., Rufty, T.W., Linton, R.W.** (1994). Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. *Plant Physiol.* 106:1107-1114.
- Lemire, J., Mailloux, R.J., Appanna, V.D.** (2008). Mitochondrial lactate dehydrogenase is involved in oxidative-energy metabolism in human astrocytoma cells (*CCFSTTG1*). *PLoS ONE* 3, e1550.
- Li, X.F., Ma, J.F., Matsumoto, H.** (2000). Pattern of aluminum induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol* 123: 1537-1543.
- Ligaba, A., Katsuhara, M., Ryan, P.R., Shibasaka, M., Matsumoto, H.** (2006). The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* 142, 1294–1303.
- Little, R.** (1988). Plant soil interactions at low pH. In: *Problem Solving – The Genetic Approach*. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 19:1239-1257.
- Liu, J., Magalhaes, J.V., Shaff, J., and Kochian, L.V.** (2009). Aluminum activated citrate and Malate transporters from the *MATE* and *ALMT* families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *Plant J.* 57: 389–399.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.S., Zhu J.K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3730–3734
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V., Herrera-Estrella L.** (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.* 160: 1-13.
- Luo M.C., Dvorák, J.** (1996). Molecular mapping of an aluminium tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. *Euphytica* 91: 31-35.

- Ma Z., Miyasaka S.C.** (1998) Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol* 118: 861–865.
- Ma, J.F., Taketa, S., Yang, Z.M.** (2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in *Triticale*. *Plant Physiol.* 122: 687-694.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E.**(2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6(6): 273-278.
- Ma, R., Yli-Mattila, T. and Pulli, S.** (2004). Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale L.*) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas* 140: 210-221.
- Ma, J.F., Bai, G.H., Carveer, B.F., Zhou, L.L.** (2005). Molecular mapping of a quantitative trait locus for aluminium tolerance in wheat cultivar Atlas 66. *Theor. Appl. Genet.* 112: 51-57.
- Mailloux, R.J., Beriault, R., Lemire, J., Singh, R., Chenier, D.R., Hamel, R.D., and Appanna, V.D.** (2007). The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE* 2: e690.
- Mailloux, R. J., Lemire, J., Kalyuzhnyi, S. and Appanna, V.** (2008). A novel metabolic network leads to enhanced citrate biogenesis in *Pseudomonas fluorescens* exposed to aluminum toxicity. *Extremophiles* 12, 451–459.
- Magalhaes, J. V., Garvin, D. F., Wang, Y., Sorrells, M.E., Klein, P.E., Schaffert, R.E., Li, L., Kochian, L.V.** (2004). Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* 167(4): 1905-1914.
- Magalhaes, J.V.** (2006). Aluminum tolerance genes are conserved between monocots and dicots. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 103: 9749-9750.
- Magalhaes, J.V.; Liu, J., Guimaraes, C.T., Lana, G.P., Alves, M.C., Wang, Y.H., Scahffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shahh, J.E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N., Kochian, L.V.**(2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (*MATE*) family confers aluminium tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39 (9): 1156-1161.
- Manyova, N.M., Miller, T.E., Forster, B.P.** (1988). Alien species as sources for aluminium tolerance genes for wheat, *Triticum aestivum*. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.* pp. 851-857.
- Maron L.G., Pineros M.A., Guimaraes C.T., Magalhaes J.V., Pleiman J.K., Mao C.Z., Shaff J., Belicuas S.N.J., Kochian L.V.**(2010). Two functionally distinct members of the *MATE* (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance *QTLs* in maize. *The Plant Journal* 61, 728–740.
- Marschner, H.** (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* 134:1-24.

- Matos, M., Camacho, M., Pérez-Flores, V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O., Benito, C.** (2004). Detection and mapping of SSRs in rye ESTs related with aluminium tolerance Genetic Variation for Plan Breeding. Eucarpia XVII. Tulln (AUSTRIA).
- Matos, M., Camacho, M.V., Pérez-Flores, V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O., Benito, C.** (2005). A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. Theor. Appl. Genet. 111: 360-369.
- Matos, M.** (2006). Detecção e localização de marcadores moleculares ligados a genes de tolerância ao alumínio em centeio (*Secale cereale* L.). Tese de Doutoramento Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. 233 pp.
- Matos, M., Pinto-Carnide, O. and Benito, C.** (2001). Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. Hereditas 134: 229-236.
- Matsumoto, H.** (2003). Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 132(4): 2256-2266.
- Melo F., Devos D., Depiereux E., Feytmans E.** (1997) a www server to assess protein structures. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.; 5:187-90.
- Meyers B.C., Lee D.K., Vu T.H., Tej S.S., Edberg S.B., Matvienko M., Tindell L.D.** (2004) *Arabidopsis* MPSS: an online resource for quantitative expression analysis. Plant Physiol 135: 801-813
- McCann M.C., Roberts K.** 1996. Plant cell wall architecture : the role of pectins. In: Visser J, Voragen AGJ, eds. Pectins and pectinases. Amsterdam: Elsevier, 91-107.
- Micheli, F.** (2000) Radial distribution pattern of pectin methylesterase across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. Plant Physiol. 124, 191-199.
- Micheli, F.** (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends Plant Sci., 6: 414-419.
- Miftahudin, T., Scoles, G.J., Gustafson, J.P.** (2002). AFLP markers tightly linked to the aluminium-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 104: 626-631.
- Miho Fujii, Kengo Y., Naoki Y., Daisuke S., Miki Y., Hirokazu T., Kazuhiro S., Mikio N. and Jian F. Ma.** (2012). Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. Nature communications. DOI: 10.1038/ncomms1726.
- Minella, E., Sorrells, M.E.** (1992). Aluminum tolerance in barley: Genetic relationships among genotypes of diverse origin. Crop Sci. 32:593-598.
- Minella, E., Sorrells, M.E.** (1997). Inheritance and chromosome location of *Alp*. A gene controlling aluminum tolerance in "Dayton" barley. Plant Breeding 116:465-469.

- Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K., Foy, C.D.** (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96:737-43.
- Moore AL., Beechey RB.** (1987) *Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects*. Plenum Press, New York
- Moscatiello, R.** (2006) Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J. Exp. Bot.* 57: 2847-2865.
- Moustacas, A-M.** et al. (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. *Biochem. J.* 279: 351-354.
- Mugai EN, Agong SG, Matsumoto H.** (2000). Aluminium tolerance mechanisms in (*Phaseolus vulgaris* L.) citrate synthase activity and TTC reduction are well correlated with citrate secretion. *Soil Science and Plant Nutrition* 46: 939-950.
- Mugwira, L.M., Patel, S.U.** (1977). Root zone pH changes and ion uptake imbalances by triticale, wheat, and rye. *Agronomy Journal* 69:719-722.
- Mugwira L.M., Elgawhary S.M., Patel K.I.** (1976). Differential tolerances of *Triticale*, wheat, rye and barley to aluminum in nutrient solution. *Agron J.* 68:782-787.
- Mugwira, L.M., S.M. Elgawhary, and S.U. Patel.** (1978). Aluminium tolerance in triticale, wheat and rye as measured by root growth characteristics and aluminium concentrations. *Plant and Soil* 50:681-690.
- Mugwira, L.M., Elgawhary, S.M.** (1979). Aluminum accumulation and tolerance of triticale and wheat in relation to root cation exchange capacity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43:736-740.
- Naranjo, T., Roca, A., Goicoechea, P.G. & Giraldez, R.** (1987). Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome*, 29: 873-882.
- Naranjo, T., Fernández-Rueda, P.** (1991). Homoeology of rye chromosome arms to wheat. *Theor. Appl. Genet.* 82: 577- 586.
- Naranjo, T., Fernandez-Rueda, P. and Maestra, B.** (1997). Chromosome rearrangements and homoeologous pairing: implications for the introgression of alien genes into wheat. In: *Lelley T (ed) Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement*. WUV-Universitätsverlag, Austria, pp 198-205.
- Narasimhamoorthy, B., Bouton, J.H., Olsen, K.M., Sledge, M.K.** (2007). Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminium tolerance in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet* 114: 901-913.
- Nava, I.C., Delatorre, C.A., de Lima Duarte, I.T., Pacheco, M.T., Federizzi, L.C.** (2006). Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). *Euphytica* 148: 353-358.

- Nguyen, B.D., Brar, B.S., Bui, B.C., Nguyen, V.T., Pham, L.N., Nguyen, H.T.** (2003). Identification and mapping of the *QTL* for aluminium tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 106:583–593.
- Nguyen, V.T., Nguyen, B.D., Sarkarung, S., Martinez, C., Paterson, A. H., Nguyen, H. T.** (2002). mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. Mol. Genet. Genomics 267(6): 772-780.
- Nguyen, V.T., Burow, M.D., Nguten, H.T., Le, B.T., Le, T.D., Paterson, A.H.** (2001). Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 102: 1002-1010.
- Niedziela, A., Piotr T. B., Henryk C., Grzegorz B., Andrzej K. and Andrzej A.** (2012). Aluminum tolerance association mapping in triticale. BMC Genomics 13: 67.
- Ohler U, S Harbeck, H Niemann, E Nöth, and MG Reese.** (1999). Interpolated Markov chains for eucaryotic promoter recognition. Bioinformatics. 15: 363-369.
- Oliveira, P.H.** (2002). Herança genética e mapeamento molecular da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia 101 f. Tese (Doutorado – Agronomia – Fitotecnia=. Programa de Pós-graduação em agronomia, UFRGS, Porto Alegre.
- Oram, R.N.** (1996). *Secale montanum* a wider role in Australasia? New Zealand Journal of Agricultural Research 39: 629-633.
- Osawa H. and Matsumoto H.** (2001) possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. Plant Physiol. 126: 411–420.
- Ownby, J.D.** (1993). Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium treated wheat roots. Physiol. Plant. 87:371-380.
- Papernik L.A., Bethea A.S., Singleton T.E., Magalhaes J.V., Garvin D.F. and Kochian L.V.** (2001). Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat. Planta 212: 829-834
- Pellet, D.M., Grunes, D.L., Kochian, L.V.** (1995). Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). Planta 196:788-795.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E.J.** (2007). New insights into pectin methyl-esterase structure and function. Trends Plant Sci. 12, 267–277.
- Persson B., and P. Argos.** (1997). Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. J Protein Chem. 16: 453-457.
- Persson, K., Diaz, O. and von Bothmer, R.** (2001). Extent and patterns of RAPD variation in landraces and cultivars of rye (*Secale cereale* L.) from Northern Europe. Hereditas 134: 237-243.

- Petersen, G. and Doebley, J.F.** (1993). Chloroplast DNA variation in the genus *Secale* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 187: 115-125.
- Petersen, G., Seberg, O., Aagesen, L. and Frederiksen, S.** (2004). An empirical test of the treatment of indels during optimization alignment based on the phylogeny of the genus *Secale* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 733-742.
- Penñuelas, J.** (2005). Aterpillars of *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) feeding on *Succisa pratensis* leaves induce large foliar emissions of methanol. *New Phytol.* 167, 851–857.
- Picton, S.J., Richards, K.D., Gardner, R.C.** (1991). Protein profiles in root tips of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars with differential tolerance to aluminum. In: *Plant soil interactions at low pH*.
- Pilling J., Willmitzer L., Fisahn J.** (2000). Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in (*Solanum tuberosum* L.) enhances stem elongation and modifies cation distribution. *Planta.*, 210: 391-399.
- Pilling, J.** (2004). Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in (*Solanum tuberosum* L.) affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta* 219:32–40.
- Pinto-Carnide, O.**(1990). Estudos no Género *Secale*. Aspectos citogenéticos e de melhoramento. Vila Real. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, 479 pp.
- Piñeros M.A., Shaff J.E., Manslank H.S., Carvalho V.M., Kochian L.V.** (2005). Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiology study. *Plant Physiol* 137: 231–241
- Polle, E., Konzak, C.F., Kittrick, J.A.** (1978). Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci.* 18:823-827.
- Poschenrieder C., Llugany M., Barcelo´ J..** (1995). Short-term effects of pH and aluminium on mineral nutrition in maize varieties differing in proton and aluminium tolerance. *Journal of Plant Nutrition* 18, 1495–1507.
- Qin R., Yasuhiro, H. and Ivano B.** (2006). Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. *Tree Physiology* 27(2): 313-320.
- Raghavendra A.S., Padmasree K., Saradadevi K.** (1994) Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.* 97:1-14
- Rajaram, S., Villegas, E.** (1990). Breeding wheat (*Triticum aestivum*) for aluminium toxicity tolerance at CIMMYT. In: *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Kluwer Academic Publishers. pp. 489-495.

- Rajaram, S., Kohli, M.M., Lopez-Cesati, J.** (1991). Breeding for tolerance to aluminum toxicity in wheat. In: Plant-Soil Interactions at Low pH. Kluwer Academic Publishers. pp. 1019-1028.
- Rakowska, M.** (1996). The nutritive quality of rye. Vortr Pflanzenzucht 35: 85-95.
- Raman, H., Moroni, J. S., Sato, K., Read, B., Scott, B.** (2002). Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in *barley* (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics 105(2-3): 458-464.
- Raman, H., Zhang, K., Fakir, M., Appels, R., Garvin, D.F., Maron, L.G., Kochian, L.V., Moroni, J.S., Raman, S., Imitas, M., Drake-Brockman, F., Waters, I., Martin, P., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, Y., Matsumoto, H., Hebb, D.M., Delhaize, E., Ryan, P.** (2005). Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of cread wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome 48(5): 781-791.
- Raman, H., Raman, R., Wood, R., Martin, P.** (2006). Repetitive indel markers within the *ALMT1* gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol. Breed. 18, 171-183.
- Raman H., Ryan P.R., Raman R., Stodart B.J., Zhang K., Martin P., Wood R., Sasaki T., Yamamoto Y., Mackay M., Hebb D.M., Delhaize E.** (2007) Analysis of *TaALMT1* traces the transmission of aluminum resistance in cultivated common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 116:343-354.
- Raman, Harsh; Stodart, Benjamin; Ryan, Peter R.; Delhaize, Emmanuel; Emebiri, Livinus; Raman, Rosy; Coombes, Neil; Milgate, Andrew.** (2010) .Genome-wide association analyses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm identifies multiple loci for aluminium resistance. Genome, Volume 53 (11): 957-966.
- Raírez-Beítez. J. Efraín, Leticia Chee-González, S.M. Teresa Hernandez-Sotomayor.** (2008) Aluminium induces changes in organic acids metabolism in *Coffea Arabica* suspension cells with differential Al-tolerance. Journal of Inorganic Biochemistry. 102:1631-1637.
- Rangel A.F., Rao I.M., Braun H.P., Horst W.J.** (2010). Aluminum resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) involves induction and maintenance of citrate exudation from root apices. Physiologia Plantarum 138: 176-190.
- Rao, M.I., Zeigler, R.A., Vera, R., Sarkarung, S.** (1993). Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. Bioscience 43: 454-465.
- Reesap T.**(1990) Carbon metabolism in mitochondria. In DT Dennis, DH Turpin, eds, Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Longman Scientific and Technical, Longman, Singapore, pp 106-123.
- Reddy, P., Appels, R. and Baum, B.R.** (1990). Ribosomal DNA spacer-length variation in *Secale* spp. (Poaceae). Plant Systematics and Evolution 171: 205-220.

- Reid, D.A.** (1970). Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. In Barley genetics II, Proc. 2nd Int Barley Genet. Symp. Ed: Nilan R.A.. Washington State University Press, Pullman, pp 409-413.
- Reid, D.A.** (1971). Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. In: Barley Genetics II. Proc. 2nd. Int. Barley Genet. Symp. Nilan, R.A. (ed.). Pullman, WA: Washington State University Press. pp. 409-413.
- Ren, C.** and **Kermode, A.R.** (2000). An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol.* 124:231-242.
- Rengel, Z., Jurkic, V.** (1993). Evaluation of *Triticum aestivum* germplasm from Croatia and Yugoslavia for aluminum tolerance. *Euphytica* 66:111-116.
- Riede, C.R., Anderson, J.A.** (1996). Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 36:905-909.
- Richards, K.D., Gardner, R.C.P.C.** (1994). The Effect of Aluminum Treatment on Wheat Roots - Expression of Heat-Shock, Histone and Shh Genes. *Plant Sci.* 98, 37-45.
- Richards, K.D., Snowden, K.C., Gardner, R.C.P.C.** (1994). *Wali6* and *Wali7* Genes Induced by Aluminum in Wheat (*Triticum- Aestivum L.*) Roots. *Plant Physiol.* 105:1455-1456.
- Richards K.D., Schott E.J., Sharma Y.K., Davis K.R., Gardner R.C.**(1998). Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116: 409-418
- Rincón, M., González, R.A.** (1991). Induction of protein synthesis by aluminum in wheat (*Triticum aestivum L.*) root tips. Kluwer Academic Publishers. pp. 851-858.
- Ring, S.M., Fisher, R.P., Poile, G.J., Helyar, K.R., Konyers, M.K., Morris, S.G.** (1993). Screening species and cultivars for their tolerance to acidic soil conditions. *Plant Soil* 155/156:521-524.
- Roberts, S.K.** (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol.* 169: 647-666.
- Rodríguez-Milla, M.A., Gustafson, J.P.** (2001). Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. *Genome* 44: 883-892.
- Rodríguez-Milla, M.A., Butler, E., Huete, A.R., Wilson, C.F., Anderson, O., Gustafson, J.P.** (2002). Expressed Sequence Tag-Based Gene Expression Analysis under Aluminium Stress in Rye. *Plant Physiol.* 130(4):1706-16.
- Roshevitz, R.I.** (1947). Monographie of the genus *Secale L.* Trudy Bot. Inst. Akad. Nauk SSSR, ser.1, Fl. Sist. Vyss. Rast. 6: 105-163.
- Rost B., G. Yachdav and J. Liu.** (2004). The Predict Protein Server. *Nucleic Acids Research* 32(Web Server issue): W321-W326.

- Ruiz-Torres, N.A., Carver, B.F., Westerman, R.L.**(1992). Agronomic performance in acid soils of wheat lines selected for hematoxylin staining pattern. *Crop Sci.* 32:104-107.
- Ryan, P.R., Ditomaso, J.M., Kochian, L.V.** (1993). Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44:437-446.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Randall, P.J.** (1995). Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 22:531-536.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D.L.**(2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:527-560.
- Ryan P.R., Raman H., Gupta S., Horst W.J., Delhaize E.** (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiology* 149:340-351.
- Ryan P.R., Raman H., Gupta S., Sasaki T., Yamamoto Y., Delhaize E.**(2010). Multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat are derived from *Aegilops tauschii* and from more recent cis mutations to *TaALMT1*. *The Plant Journal* doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04338.x.
- Saber N., Abdel-Moneim A., Barakat S.** (1999). Role of organic acids in *sunflower* tolerance to heavy metals. *Biologia Plantarum* 42:65-73.
- Saher, S.**(2005). Pectin methylesterases and pectins in normal and hyperhydric shoots of carnation cultured in vitro. *Plant Physiol. Biochem.* 43:155-159.
- Sánchez-Chacón, C.D., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K., Pacheco, M.T.** (2000). Variabilidade genética e herança de la tolerancia á toxicidade do alumínio em aveia. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35: 1797-1808.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, Y., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E., Matsumoto, H.** (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant Journal* 37(5): 645-653.
- Sasaki, T., Ryan, P. R., Delhaize, E., Hebb, D. M., Ogiwara, Y., Kawaura, K., Noda, K., Kojima, T., Toyoda, A., Matsumoto, H., Yamamoto, Y.**(2006). Sequence Upstream of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* Gene and Its Relationship to Aluminum Resistance. *Plant Cell Physiol.* 47(10):1343-54.
- Salinas, J. and C. Benito**,(1984). Phosphatase isozymes in rye: Characterization genetic control and chromosomal location. 2. *Pflanzenzuecht.* 93: 1 15-1 36.
- Savenstrand H., Brosche, M., Angehagen M., Strid A.** (2000) Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell Environ* 23:689-700.

- Schmohl, N.**(2000). Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 109, 419–427.
- Sencer, H.A.**, (1975). Study of variation in the genus *Secale L.* and on the origin of the cultivated rye. Ph.D. Thesis, University of Birmingham
- Sencer, H.A.** and **Hawkes, J.G.** (1980). On the origin of cultivated rye. *Biol. J.Linn. Soc.* 13: 299-313.
- Sibov S.T., Gaspar M., Silva M.J.** (1999). two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome, Ottawa* 42: 475-482.
- Silva-Navas, J., C. Benito, B. Téllez-Robledo, D.Abd El-Moneim, F.J.Gallego.**(2012) The *ScaACT1* gene at the *Qalt5* locus as a candidate for increased aluminum in rye (*Secale cereale L.*) .*Mol. Breeding* .
- Silva I.R., Smyth T.J., Israel D.W., Raper C.D., Ruffy T.W.** (2001). Magnesium is more efficient than calcium in alleviating aluminum rhizotoxicity in soybean and its ameliorative effect is not explained by the gouychapman-stern model. *Plant Cell Physiol.* 42(5): 538-545.
- Smith, B.G. and Harris, P.J.** (1999) .The polysaccharide composition of poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 33–53
- Snowden, K.C., Gardner, R.C.** (1993). Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum L.*) roots. *Plant Physiol.* 103: 855-861.
- Schulz, B., Kolukisaoglu, H.** (2006). Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett.* 580, 1010–1016.
- Sledge, M.K., Bouton, J.H., Dall' Agnoll, M., Parrot, W.A., Kochert, G.** (2002). Identification and confirmation of aluminum tolerance *QTL* in diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. *Crop Sci.* 42 1121-1128.
- Sloutmaker, A.L.J.** (1974). Tolerance to high soil acidity in wheat related species, rye and triticale. *Euphytica* 23:505-513.
- Sobry, S.**(2005). Immunocytochemistry of pectins in shoot apical meristems: consequences for intercellular adhesion. *Protoplasma* 225, 15–22.
- Sorrells, M.E., La Rota, M., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R., Munkvold, J.D., Miftahudin, Mahmoud, A., Ma, X., Gustafson, P.J., Qi, L.L., Echaliier, B., Gill, B.S., Matthews, D.E., Lazo, G.R., Chao, S., Anderson, O.D., Edwards, H., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Akhunov, E.D., Dvorak, J., Zhang, D., Nguyen, H.T., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Hossain, K., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Choi, D-W., Close, T.J., Dilbirligi, M., Gill, K.S., Steber, C., Walker-Simmons, M.K., McGuire, P.E. and Qualset, C.O.** (2006).

- Comparative DNA Sequence Analysis of Wheat and Rice Genomes. *Genome Res* 2003 13: 1818-1827.
- Shang, H., Wei, Y., Wang, X. and Zheng, Y.** (2006). Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 29 (4): 685-691.
- Sibov, S.T., Gaspar, M., Silva, M.J., Ottoboni, L.M.M., Arruda, P., Souza, A.P.** (1999). Two genes control aluminium tolerance in maize: genetic control and molecular mapping analices. *Genome* 42: 475-482.
- Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.H., Tong, H., Osawa, H., Baluska, F., Volkmann, D., Matsumoto, H.** (2003). Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132(4): 2256-2266.
- Somers, D.J., Gustafson, J.P.** (1995). The expression of aluminum stress induced polypeptides in a population segregation for aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 38:1213-1220.
- Somers, D.J., Briggs, K.G., Gustafson, J.P.** (1996). Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. *Physiol. Plant.* 97:694-700.
- Stutz, H.C.** (1972). On the origin of cultivated rye. *American Journal Botany* 59: 59-70.
- Suhayda, C.G., Haug, A.** (1986). Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. *Physiol. Plant.* 68:189-95.
- Stølen, O., Andersen, S.** (1978). Inheritance of tolerance to low soil pH in barley. *Hereditas* 88:101-105.
- Tamura K, Dudley J., Nei M., Kumar S.** (2007) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S.** (2011). MEGA5. *Mol. Biol. Evol.*
- Tang, Y., Sorrells, M.E., Kochian, L.V., Garvin, D.F.** (2000). Identification of RFLP markers linked to barley aluminium tolerance gene Alp. *Crop. Sci.* 40: 778-782.
- Tang, Y., Garvin, D., Kochian, L.V., Sorrells, M. and Carver, F.** (2002). Physiological genetics of aluminum tolerance in the wheat cultivar Atlas 66. *Crop Science*, vol. 42, no. 5, p. 1541-1546.
- Taylor, G.J.** (1988). The physiology of aluminum phytotoxicity. In: *Metal ions in biological systems: Aluminum and its rule in biology*, Sigel, H., and A. Sigel (eds.). Vol. 24:123-163, Marcel Dekker, New York.

- Taylor, G.J.** (1991). Current Views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance. *Current Topics of Plant Biochemistry and Physiology* 10:57-93.
- Taylor, G.J.** (1995). Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminum resistance. *Plant Soil* 171:89-103.
- Tesfaye M, Temple S, Allan D, Vance C and Samac D.** (2001). Over expression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol.* 127: 1836–1844.
- Tian, G.W.** (2006). Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev. Biol.* 294, 83–91.
- Tice, K.R., Parker, D.R., McMason, D.A.** (1992). Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100:309-318.
- Tieman D.M., Handa A.K.** (1994). Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits. *Plant Physiology* 106, 429-436.
- Thomas, G.W., Hargrove, W.L.** (1984). The chemistry of soil acidity. In: *Soil Acidity and Liming*. Adams, F. (ed.). American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. pp. 3-56.
- Tusnády G.E. and I. Simon.** (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Applications to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283: 489-506.
- Ulrich, B., Mayer, R., Khanna, P.K.** (1980). Chemical changes due to acid precipitation in a loess-derived soil in Central Europe. *Soil Sci.* 130:193-199.
- Van Buren, J.P.** (1973). Improves firmness without additives. *Food Engineering*, 45 (5): 127.
- Van der Heijden R.T., Snel B., van Noort V., Huynen M.A.** (2007). Orthology prediction at scalable resolution by phylogenetic tree analysis. *BMC Bioinformatics* 8:83
- Van Wambeke, A.** (1976). Formation, distribution and consequences of acid soils in agricultural development. In: *Proceedings of Workshop on Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils*.
- Vavilov, N.I.** (1917). On the origin of cultivated rye. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed* 10: 561-590.
- Vavilov, N.** (1926). Studies of the origin of cultivated plants. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed* 16 :1-248.
- Vences, F.J., Vaquero, F. and Pérez de la Vega, M.** (1987). Phylogenetic relationships in *Secale* (*Poaceae*): an isozymatic study. *Plant Syst* 157: 33-47.

- Von Dahl, C.C.** (2006). Caterpillar-elicited methanol emission: a new signal in plant-herbivore interactions? *Plant J.* 46, 948–960.
- Von Uexkull, H.R., Mutert, E.** (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171:1-15.
- Vorwerk, S.** (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 9, 203–209.
- Wagatsuma, T., Akiba, R.** (1989). Low surface negativity of root protoplasts from aluminum-tolerant plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35:443-452.
- Wagner, C.W., Milach, S.C.K., Federizzi, L.C.** (2001). Genetic inheritance of aluminum tolerance in oat. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1:22-26.
- Wang Y., Stass A., Horst W.J.** (2004) Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiol* 136:3762–3770.
- Wang, J.P., Raman, H., Zhang, G.P., Mendham, N., Zhou, M.X.** (2006). Review. Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. *J. Zhejiang Univ Sci. B.* 10: 769-787.
- Wang, J., Raman, H., Zhou, M., Ryan, P.R., Delhaize, E., Hebb, D.M., Coombes, N., Mendham, N.** (2007). High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 115: 265-276.
- Wang, R.C., Bothmer, R., von Dvorak, J., Fedak, G., Linde-Laursen, I. and Muramatsu, M.** (1996). Genome symbols in the Triticeae (*Poaceae*). *Proceedings of the 2nd international Triticeae symposium.* Utah State University Press. Utah, USA. pp. 29-34.
- Wen, F.** (1999) Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11, 1129–1140.
- Wight C.P., Kibite S., Tinker N.A., Molnar S.J.** (2006). Identification of molecular marker for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and *QTL* analysis. *Theor Appl. Genet.* 112: 222-231.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P.** (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47, 9–27.
- Wu, P., Liao, C.Y., Hu, B., Yi, K.K., Jin, W.Z., Ni, J.J., He, C.** (2000). *QTLs* and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1295-1303.
- Yamaguchi, Mineo; Sasaki, Takayuki; Sivaguru, Mayandi; Yamamoto, Yoko; Osawa, Hiroki; Juahn, Sung and Matsumoto, Hideaki.** (2005). Evidence for the plasma membrane

- localization of Al-activated malate transporter (*ALMT1*). *Plant and Cell Physiology*, vol. 46, no. 5, p. 812-816.
- Yamaji N., Huang C.F., Nagao S., Yano M., Sato Y., Nagamura Y., Ma J.F.** (2009). A zinc finger transcription factor *ART1* regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21: 3339–3349.
- Yamamoto Y., Yukiko Kobayashi Y., Matsumoto H.** (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol* 125: 199–208.
- Yang, Z.M., H. Yang, J. Wang, and Y.S. Wang.** (2004). Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-responsive citrate efflux in the roots of (*Cassia tora* L.) *Plant Sci.* 166: 1589-1594.
- Yang, J.L., Li, Y.Y., Zhang, Y.J., Zhang, S.S., Wu, Y.R., Wu, P., Zheng, S.J.** (2007). Cell Wall Polysaccharides are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminum from the Rice Root Apex. *Plant Physiol.*
- Yang J.L., Li Y.Y., Zhang Y.J., Zhang S.S., Wu Y.R., Wu P., Zheng S.J.** (2008). Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146: 602–611.
- Yin L., Mano J., Wang S., Tsuji W., Tanaka K.** (2010). The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant Physiol Vol.* 152, pp. 1406–1417.
- Yokosho K., Naoki Y., Daisei U., Namiki M. and Jian F. Ma.** (2009). *OsFRDL1* Is a Citrate Transporter Required for Efficient Translocation of Iron in Rice. *Plant Physiology* 149 (1): 297-305.
- Yokosho K., Yamaji N., Ma J.F.** (2010). Isolation and characterization of two *MATE* genes in rye. *Functional Plant Biology* 37, 296–303.
- Yu, L.H., Umeda, M., Liu, J.Y., Zhao, N.M., Uchimiya, H.** (1998). A novel MT gene in rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene* 206: 29-35.
- Zakir Hossain, A.K.M., Koyama, H., Hara, T.,** (2006). Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. *J. Plant Physiol.*, 163(1):39-47.
- Zhang, G., Taylor, G.J.** (1989). Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of (*Triticum aestivum* L.) *Plant Physiol.* 91:1094-1099.
- Zheng S.J., Ma J.F., Matsumoto H.** (1998). High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced special secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol* 117:745–751.

- Zhang, G., Taylor, G.J.** (1991). Effects of biological inhibitors on the kinetics of aluminum uptake by excised roots and purified cell wall material of aluminum tolerant and aluminum-sensitive cultivars of (*Triticum aestivum* L.) J. Plant Physiol. 138:533-539.
- Zhang, G., Hoddinott, J., Taylor, G.J.** (1994). Characterization of 1,3-b-D-Glucan (*callose*) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity. Plant Physiol. 144:229-234.
- Zhao Z., Ma J.F., Sato K., Takeda K.** (2003). Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). Planta 217, 794:800.
- Zheng, S.J, MA, J., Matsumoto, H.** (1998). High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. Plant Physiol 117: 745-751.
- Zhou, H., Zhou, Y.** Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. (2002) Protein Sci.11(11):2714-26.
- Zhu J.K.** (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. Curr. Opin. Plant Biol. 4:401-406.
- Zhukovsky, P.M.** (1933). Roggen. Vsesoiuzn. akad. selsk. khoz. nauk lenina, Ins. Rastenievod. Leningrad.
- Zhukovsky, P.M.** (1928). A new wild growing form of rye in Anatolia. Bull. Appl. Bot. 19: 49-52.
- Zieliński, H., Ceglińska, A. and Michalska, A.** (2007). Antioxidant contents and properties as quality indices of the rye cultivars. Food Chemistry 104: 980-988.
- Zohary, D.** (1971). Origin of southwest Asiatic cereals: wheats, barley, oats and rye. Em: Davis, P. H., Harper, P.T. e Hedge, I. ed., Plant life of south-west Asia. Botanic Society Edinburgh. pp. 235-260.
- Zohary, D. and Hopf, M.** (2000). Domestication of plants in the Old World. 3rd ed. Oxford University Press, New York, pp. 69-72.

Páginas web:-

www.fao.org

www.faostat.fao.org

www.ars-grin.gov

www.brachypodium.org/

www.ncbi.nlm.nih.gov/

www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

www.jmol.org

www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/

www.cbs.dtu.dk/services/TargetP

www.mbb.ki.se/tmap/index.html

www.bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html

www.enzim.hu/hmmtop/

www.embl-heidelberg.de/predictprotein/

www.enzim.hu/DAS/DAS.html

www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

www.genes.mit.edu/McPromoter.html

www.genomatix.de/online_help/help_gems/PromoterInspector_help.html

www.research.i2r.astar.edu.sg/promoter/promoter1_5/DPF.htm

www.genome.lbl.gov/vista/rvista/about.shtml

VIII. APÉNDICES

APÉNDICES I:-

Parejas de “primers” utilizadas en este trabajo

8.1 MALATO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL (*ScMDH1* y *ScMDH2*):-

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm°C	Ciclos	referencia
ScMDH1-ADNc -F	ATGTCGCTGCTGAGATCCGCGTC	55	35	Sato K.,y col. 2009
ScMDH1-ADNc -R	GGCAGGTCGCCGCTAGCTCTCC	55	35	Sato K.,y col. 2009
ScMDH1-IN1-F	ACGTCTCCCACATCAACACCC	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN1-R	CCGAGCTGGTCGTCCCCACG	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN2-F	TGCACCGCCATCGCCAGGCAC	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN2-R	GACAGGGTTGCTGATCATATT	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN3-4-F	TCGACTGTCCCAATTGCAGCTGAGG	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN3-4-R	CGCTTCAACAACCTCCGTTCACCA	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN5-F	TGGAAAGGGCTCAGCAACATT	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN5-R	CATCTCCAAAACTGCACCAG	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN6-F	AGAGCTGCCATTCTTTGCCTC	60	35	Este trabajo
ScMDH1-IN6-R	CACCTCCTCCACTCCGCTCTT	60	35	Este trabajo
ScMDH1-PRO-F	TTTGATGTCACTTCAAGGCTGAC	62	35	<i>Brachypodium</i>
ScMDH1-PRO-R	TGCGCGGGCGTCGACGAGTAGGC	62	35	Este trabajo
ScMDH1-F-DN	GGAGAGCCTCAAGGGCGAGCTGC	58	35	Este trabajo
ScMDH1-R-DN	TGACACGTAATCTGCCGTCAGAA	58	35	<i>Brachypodium</i>
ScMDH1-loc-F	CTACTCGTCGACGCCCCGCGCAG	70	33	Este trabajo
ScMDH1-loc-R	GGCGGGGATGATGACGAGGTCC	70	33	Este trabajo
ScMDH2-ADNc -F	ATGAGGTCCTCGGTGATGAGAT	55	35	Sato K.,y col. 2009
ScMDH2-ADNc -R	TAATCTGCAAAATGGCCTAACTA	55	35	Sato K.,y col. 2009
ScMDH2-IN1-2-F	CGCTGTCTCTCCTCATGAAGCTGA	62	35	Este trabajo
ScMDH2-IN1-2-R	CAGGGTTGCTGATCATGTTGACAAAG	62	35	Este trabajo
ScMDH2-IN3-F	ATGCTGGGAAGGCTAATGTAG	60	35	Este trabajo
ScMDH2-IN3-R	GCATGACCACCAACAACAGGA	60	35	Este trabajo
ScMDH2-IN4-5-F	TGACCACTCTTGATGTTGTCCGTGC	62	35	Este trabajo
ScMDH2-IN4-5-R	CAATGTCAGGGACTCCGTTGACACC	62	35	Este trabajo
ScMDH2-IN6-F	TCACCGAGCTGCCATTCTTTG	60	35	Este trabajo
ScMDH2-IN6-R	CACCTCCTCGACTCCATTCT	60	35	Este trabajo
ScMDH2-PRO-1F	TTTGATGTCACTTCAAGGCTGAC	58	35	Este trabajo
ScMDH2-PRO-1R	GATCTCATCACCGAGGACCTCAT	58	35	Este trabajo
ScMDH2-PRO-2F	TTTGATGTCACTTCAAGGCTGAC	60	35	Este trabajo
ScMDH2-PRO-2R	CGGAGGAGCTGGGCGGCGGATCT	60	35	Este trabajo
ScMDH1 -QPCRf	GCGCCCTCGTGAAGGGGTTC	60	40	Este trabajo
ScMDH1-QPCR-R	GTGCAGAGGCCCTTGACGAT	60	40	Este trabajo
ScMDH2 -QPCRf	CCTGCCCTGGTCAAGGGTTT	60	40	Este trabajo
ScMDH2-QPCR-R	CCGGCGTTAATGTTGAAGAG	60	40	Este trabajo
18S-FWD	TCAACGAGGAATGCCTAGTAAGC	60		
18S-REV	ACAAAGGGCAGGGACGTAGTC	60		

8.2 CITRATO SINTASA (*ScCS*) :-

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm°C	Ciclos	referencia
ScCS-ADNc -F	GCAGCGTGCTCCGGCCATGGCGTT	55	35	Sato K.y col. 2009
ScCS-ADNc -R	TTGGTAAGACGATGAACTGGTGTA	55	35	Sato K.y col. 2009
ScCS-IN1-2-F	CTCGAGGTTGCGATCCCGTATGG	58	35	Este trabajo
ScCS-IN1-2-R	CCTGCAGCTGGGACCTAAGATCA	58	35	Este trabajo
ScCS-IN3-F	GGAAATGATTCCGGAGCAACAGG	58	35	Este trabajo
ScCS-IN3-R	CTCTGACTTTAGTTTCTTCAAGC	58	35	Este trabajo
ScCS-IN4-5-F	GGAAACATAACTGTGGACATGGT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN4-5-R	AGAGAGACCTCTAAATCGAATAC	58	35	Este trabajo
ScCS-IN6-F	TGGCTTCTTTTGACGGGAAAGGT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN6-R	CATCAACTTGCTCCTTGTTGGC	58	35	Este trabajo
ScCS-IN7-F	TTAGCCGTTGCGACTGTTCCAGGT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN7-R	GCATCTATCGCCTTATAGACATA	58	35	Este trabajo
ScCS-IN8-9-10-11-F	CTCATCCAATGACACAGTTTACC	58	35	Este trabajo
ScCS-IN8-9-10-11-R	ACCAGATGCCCTGTATGAGCACT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN12-F	AGTGCTCATAACAGGCATCTGGT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN12-R	CAGTGCCGCTGCAAAAGAAAGGT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN13-14-F	TGGAAGTGCTCTGTCAGATCCCT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN13-14-R	CTCCATGACCATAGCCAGGAACA	58	35	Este trabajo
ScCS-IN15161718F	GAGGACCCACTTTTCCAAGTGGT	58	35	Este trabajo
ScCS-IN15161718R	CCAAGGGCACGGTCCCAGATGAG	58	35	Este trabajo
ScCS-loc-F	GGA TGA CTG GAA TGC TTT GGG AG	58	33	Este trabajo
ScCS-loc-R	TTG TTT TGG GCA TTC CCT TGT CA	58	33	Este trabajo
ScCS -QPCR-F	CTCGTGCCAAAGGGAGTTTG	60	40	Este trabajo
ScCS-QPCR-R	ACTCGGTGAGGATCGGAGG	60	40	Este trabajo
18S-FWD	TCAACGAGGAATGCCTAGTAAGC	60		
18S-REV	ACAAAGGGCAGGGACGTAGTC	60		

8.3 FUMARASA MITOCONDRIAL (*ScFUM*)

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm°C	Ciclos	referencia
ScFUM-ADNc -F	CGAGATGGCGATGGTTCTGCGAC	58	35	Sato K.y col. 2009
ScFUM-ADNc -R	TTAATCAGAAGGGCCAATCATTTT	58	35	Sato K.y col. 2009
ScFUM-loc-F	CTC AAG GTG GGA CTG CAG TTG GC	54	33	Este trabajo
ScFUM-loc-R	CAT GGA ATT CCT TTT CCG TCA AG	54	33	Este trabajo
ScFUM -QPCR-F	AGTGCGCCGCTAAGGTGAAT	60	40	Este trabajo
ScFUM-QPCR-R	AACAAGCGGAAAGTGATCGTC	60	40	Este trabajo
18S-FWD	TCAACGAGGAATGCCTAGTAAGC	60		
18S-REV	ACAAAGGGCAGGGACGTAGTC	60		

8.4 PECTIN METILESTERASA (*ScPME*) :-

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm°C	Ciclos	referencia
ScPME-F	ACGGCAGCGGGCAGTTCAAG	58	35	Krill et al. 2010
ScPME-R	TGCGCCGTCACCGAGTTCTG	58	35	Krill et al. 2010
PME-GSP1-UP1	GGCGCTGAGGGTGCAGGGCGACCTCT	67	39	Este trabajo
GW-AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	67	39	Genome Walker™
PME-GSP1-DN1	CGTACATGAATATGTTACCTTGTCT	67	39	Este trabajo
GW-AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	67	39	Genome Walker™
PME-GSP2-UP1	TACGTGCACGCCCGGCGCCAGTTCTT	67	39	Este trabajo
GW-AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	67	39	Genome Walker™
PME-GSP2DN1	CACGGCATCCTGGATGGTCTTGAAC	67	39	Este trabajo
GW-AP2	CATGGGACGGCGAACCTGATGTTTATA	67	39	Genome Walker™
PME-GSP1-UP2	TTCATCGACGGTGCACATGGCTCAA	67	39	Este trabajo
GW-AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	67	39	Genome Walker™
PME-GSP1-DN2	GGCGCACGAAGACTTGACCGACTTGC	67	39	Este trabajo
GW-AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	67	39	Genome Walker™
PME-GSP2-UP2	TGTGTACGGAACGTGTGATGACTGAT	67	39	Este trabajo
GW-AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	67	39	Genome Walker™
PME-GSP2-DN2	GCCTTATTATTGCCGAGGTGGTCAC	67	39	Este trabajo
GW-AP2	CATGGGACGGCGAACCTGATGTTTATA	67	39	Genome Walker™
ScPME-gDNA-F	GGCCGAAATGGCAAATAACTTCC	58	35	Este trabajo
ScPME-gDNA-R	ACTCGTATCTCATGTACAGGAGG	58	35	Este trabajo
ScPME-loc-F	CGGCGGTGGAGCGGTCCC	63	33	Este trabajo
ScPME-loc-R	GGCGGCGCGAGTCGGTCTTG	63	33	Este trabajo
ScPME-PRO-F	TCTTTACATGTCTACCGCCCAAA	60	35	Este trabajo
ScPME-PRO-R	GATTGCCCCCAGGCCTCCGAGGA	60	35	Este trabajo
ScPME-F-DN2	ACGCCTGCGCCCTCCTGTACATGAG	58	35	Este trabajo
ScPME-R-DN2	ACACGTATCGGGCCTGATCGG	58	35	Este trabajo
ScPME -SqPCR-F	AGTCCAAGTACCCCGCGTG	58	33	Este trabajo
ScPME -SqPCR-R	GGCATCCTGGATGGTCTTGA	58	33	Este trabajo
Actina_semiq-F	ATCAGGAAGGACCTGTACGGC	58	33	
Actina_semiq-R	GTTGGAAGGTGCTGAGTGAGG	58	33	

8.5 TRANSPORTADORES DE MALATO ACTIVADOS POR ALUMINIO (ScALMT1)

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm°C	Ciclos	referencia
ScALMT1-PRO-F	GCCGTCGATCTCTCTGCCGTGATCAA	60	35	Fontecha y col. 2007
ScALMT1-PRO-R	CTCTTTCCTAAGTAGAGGTGGTCC	60	35	Fontecha y col. 2007
ScALMT1-EX1-F	ATGGATATTGATCACGGCAGAGA	58	35	Fontecha y col. 2007
ScALMT1-EX1-R	CGCCCGCGCGTACCGACGGTGAA	58	35	Fontecha y col. 2007
ScALMT1-EX5&6-F	ACAATGGCATATTTGGCATCC	62	40	Fontecha y col. 2007
ScALMT1-EX5&6-R	CAAACGCAACTTGATGTGGG	62	40	Fontecha y col. 2007

APÉNDICES II:-

Todas las secuencias obtenidas durante el desarrollo de esta tesis se han incluido en un CD adjunto.

Lista de Secuencias

II.1. Secuencia del gen *ScALMT1* (promotor, Exón1, Intrón5 y Exón 6) para (12, 11, 4 y 10) cultivares respectivamente.

II.2. Secuencia ADNc del gen *ScMDH1* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuencia de ADNg, del promotor y *downstream* del cultivar Ailés.

II.3 Secuencia ADNc del gen *ScMDH2* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuencia de ADNg y del promotor del cultivar Ailés.

II.4. Secuencia ADNc del gen *ScCS* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuenciade ADNg del cultivar Ailés.

II.5. Secuencia ADNc del gen *ScFUM* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva).

II.6. Secuencia ADNc del gen *ScPME* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuencia de ADNg, del promotor y *downstream* de cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva).

Apéndice II.1A Secuencias de parte de la región promotora del gen *ScALMT1*.

>Cultivar 1

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTCTG
CTAACGCGGCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGTAGTACATCTTTTTTTTCCATTGCAA
CACACCAACACGTATGCTAGTTGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCAT
ATGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCAACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCAACTGATTTGGGCAGCCCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGGGAGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 2

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTCTG
CTAACGCGGCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 3

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTCTG
CTAACGCGGCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTYGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 4

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATGGCATCGGTTTCGGKTTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTCTG
CTAACGCGGCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGTAGTACATTTTTTTTTTCTATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGTCTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 5

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTCTG
CTAACGCGGCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTYGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA

GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 7

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACCCAGGACGGGATCTT
TTCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTTTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGT
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
AGCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGC
GCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGC
GGTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTAC
CTCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTG
CCGCC

>Cultivar 8

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TTTCCGTGCAACGTCACTTGATTCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTTTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGT
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 9

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAAMGTCACTTGATCCGAGGGGGGGGCCAAGGCAGGGTTTTTGCTTTGTTGGCAGTTAGCGGAACCTGGGT
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTTGTAGGGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 10

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGT
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCTGAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 11

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGCCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGT
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCTGAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA

CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
GCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 12

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
GCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 13

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTKCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAA
CACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCAT
ATGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
AAGCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTCGGATCCGGCGGAGGCACG
CGCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCG
CGGTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTA
CCTCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCT
GCCGCC

>Cultivar 14

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGGGACTCAGGACGGGATCTT
TTTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTTTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTTGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
GCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 15

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTC
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGTCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
AGCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
GCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GGTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
CTCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CCGCC

>Cultivar 18

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTACTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTYGTTTGAGGCCAGATTTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
AGCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGC
GCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGC
GGTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCCACCCACTAC
CTCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCAGAGCCATCCTTGCATCTG
CCGCC

>Cultivar 19

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACAWTTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTTGTTTGAGGCCAGATTTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
AGCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGC
GCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGC
GGTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCCACCCACTAC
CTCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTG
CCGCC

>Cultivar 20

AAGGAGAGGGGGTCCMCTCAGGGCCCCGAAAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 21

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGGACATTTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTYGTTTGAGGCCAGATTTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
AGCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGC
GCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGC
GGTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCCACCCACTAC
CTCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTG
CCGCC

>Cultivar 22

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGGGACTCAGGACGGGATCTT
TTTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGGGGCGGCCAAGGCARCGTTTTTKGTTTGTYGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
CTAARGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAARCATGTTGGGGTTTGCTTTGTAGTGAARCACTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTCGCAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCCACCCACTACC

TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 23

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGGGTTGGGTGTGGGATCCAAGTGGGGGACTCAGGAAGGGATTTT
TTTCCGTGCAACGTCACCTTGATTTCGAGGTGGGGGCCATGGCAGCGTTTTTGCTTTGTTGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTTGTAGGGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 24

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 26

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTC
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAG
CACGTACGGACGGTTCGAGTGGCGAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCGCGCGC
TCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCGG
TTGATGGGTTAGGAGGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACCTC
AAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGCGG
CC

>Cultivar 28

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
ACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCGG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGCATCTGC
CGCC

>Cultivar 31

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTGGCTGTGCGATCCTACGTGGGGGACTCAGGACGGGATCTT
TTTCCGTGCAACGTCACCTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGGGTTTTTGCTTTGTTCGGCAGTTAGGGGAACCTGGGTTCG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTTGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTCCCCCAAAAAAAA

GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGATCTGCG
CGCC

>Cultivar 34

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATATG
CATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAAAG
CACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCGC
TCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCGG
TTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACCT
CAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGATCTGCG
GCC

>Cultivar Petkus

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCAAGGTCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCCGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCAACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCAACTGATTTGGGCAGCCCCG
GTTGATGGGTTTAGGAAGAATGTGAGGGAGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACC
TCAAAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGATCTGCG
CGCC

>Cultivar Ailés

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
GCTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAAC
ACACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATA
TGCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
AGCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCGAGGCCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCTGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGC
GCTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGC
GGTTGATGGGTTAGGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACCTCA
AAAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGATCTGCGCG
C

>Línea consanguínea Riodeva

AAGTAGAGGTGGTCCACTCAGGGCCCCGCATAGCATCGGTTTCGGCTGTGCGATCCTACGTGGGCGACTCAGGACGGGATCTT
TCTCCGTGCAACGTCACTTGATCCGAGGTGGCGGCCATGGCAGCGTTTCTGCTTTGTTCGGCAGTCAGCGGAACCTGGGTG
CTAACGCGGCCCTTTGCTCCATAGTGAAGCATGTTGGGGTTTGCTTCGTAGTGAAGCAGTACATTTTTTTTTTTCATTGCAACA
CACGAACATGTATGCTAGATGCACTAATGTAGATTGACTTCGTTTGAGGCCAGATTTTTTCATAACCTCCTTTTCAGCATAT
GCATTGCCACTACGGTTGCGCTCCACACGCACGAGCAGCAGGCAGCAGCACATCGGGTACATGATATTTTTTCAAAAAA
GCACGTACGGACGGTTCGACAGGGGCGAGGCCGTATCTGGCAGCGGCGTGCCCTGAGGAGGTTCGGATCCGGCGGAGGCACGCG
CTCGGAGAGGCCGCATCCAGCGGAGGCGACCGGCACACCGGCTCGCCGTGGTGCCCCCTGGCGACTGATTTGGGCAGCGCG
GTTGATGGGTTAGGAATGTGAGCGCGCCATGTGTTTGTCCGCCAGTGCCTTACCGCCACCTTTGCCACCCACTACCTCAA
AAGGCGCGTGCTAGGCTACCATATTACTCCTACTTAATTAGCAGCGCCGTACGCACCTGAGCCATCCTTGATCTGCGCGC

Apéndice II.1B Secuencias del Exón 1 del gen *ScALMT1*.

>Cultivar 1

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGCGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGCGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 2

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGCGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGCGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 3

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGCGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 4

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 5

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 8

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 10

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGCGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 11

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGCGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 12

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGCTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTCACCGTCGGT

>Cultivar 40

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGGTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTCACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTACCGTCGGT

>Cultivar 42

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGGTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTCACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTACCGTCGGT

>Cultivar 44

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGGTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGCGGGCGGCGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTCACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTACCGTCGGT

>Cultivar 45

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGGTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGCGGGCGGCGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTCACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTACCGTCGGT

>Cultivar Ailes

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGGTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTCACGCCGCTCTTCAACGGCCTCGGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTACCGTCGGT

>Línea consanguínea Riodeva

ATGGATATTGATCACGGCAGAGAGATCGACGGCGAGATGGTGAGCACCATCGCCAGCTGCGGGGTGCTGCTCCACTCGCTT
CTCGCCGGGTTCGCCCCGAAGGTGGGCGGCGCCGCGCGGGAGGACCCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAGGTCGGCCTG
GCGCTCGCGCTGGTGTCCGCCGTCTACTTCGTCACGCCGCTCTTCAACGGCCTCAGGGTCTCCGCGATATGGGCCGTGCTC
ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTTACCGTCGGT

Apéndice II.1C Secuencias del Exón 6 del gen *ScALMT1*.

>Cultivar 1

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 2

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 3

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCATGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 4

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCATGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGGG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGAGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGTTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGGGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGAAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 5

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGAAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 8

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 10

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 11

TACCTGTCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC

>Cultivar 32

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCATGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGATAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 33

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 34

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGGG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGACCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATTCACATGGCATTACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGTCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 37

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTACCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 39

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 40

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 42

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGCTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 44

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCATGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGCTCGAAATGGCAATTGGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAAAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGTTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCTAGCAAGACTGGCAGACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar 45

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGGCTCGAAATGGCAATTCGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACCGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCACACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTAGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Cultivar Ailes

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCATGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGGCTCGAAATGGCAATTCGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGCA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGATAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAACGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCACACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTTGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

>Línea consanguínea Riodeva

TACCCTGCAGCAGCCAACCCAGAGTTATCCTTCAAGGTTGCGAAAGACATGTCGTGAAATGAGCACACATTCCGCCAAGGTG
CTTAGGGGGGCTCGAAATGGCAATTCGAACAATGACTGTGCCGTATCTAGCAAACAATACCGTGGTTGTGGCCATGAAAGTA
GCGGAAAGGCTCAGAAGCGAGCTTGAAGAGAATGCGGCTTTGTTGCAAGTGATGCACATGGCAGTCACCGCAATGCTTCTC
GCGGACTTGGTTGATCGGGTGAAGGAAATCACGGAATGTGTTGATGTCCTAGCAAGACTGGCACACTTTAAGAACCCTGAG
GATGCCAAATATGCCATTGTTGGTGCCTTAACTCGAGGGATTGACGATCCTTTGCCTGACGTGGTTATTTTGTA

Apéndice II.1D Secuencias del Intrón 5 del gen *ScALMT1*.

>Cultivar 1

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 2

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 3

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 4

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 5

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 8

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 10

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 11

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 12

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 15

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 16

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 17

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 19

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 20
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 21
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 22
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 23
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 24
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 25
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 27
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 26
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 28
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 29
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 31
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 32
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 33
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 34
GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 37

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 39

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 40

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 42

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 44

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar 45

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTCATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Cultivar Ailes

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAATGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGACCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

>Línea consanguínea Riodeva

GTAGAACTCTAGCCCCTAAAACCACCCCATTTTATGTTCAAAACAAGGCCGAGACAACTGAATGAAATAACCGATCAAAC
TGACATATTTGTTTCATGTTGATCATCAG

Apéndice II.2 Secuencia ADNc del gen *ScMDH1* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuencia de ADNg, del promotor y *downstream* del cultivar Ailés.

***ScMDH1* Ailés clon 2**

GTCGACGAGTAGGCCCGTGAGATCGAGGCGGCTGAAGCAGAGGACTGCTGCGACTGCGAGTGACATGGTGATGGCCA
CGGCCGGAATGAGCGCGCGACACCACGTCACGGCGTGTGACGGCGCGCGTGCAGCTGGGCCGACAAGCTGCTTAT
TGCCGGCGCAGATGCATGACCGGTATGGATAGACCGACGACATGTGTCCCTGGCGAACAATGCCCTTGAAAATGTGA
GCGCCGTCGTATGCACAGGCCTCGATTCCACCACATGGCAGAACAATAACCAAGCAATGGGCGCATCTATTGACTAA
ACCAAAGTAAGTTCTTTACAGTGATTTCCGTTGCCAACAGTTAATCCGGTCGTGCAACCATCCTACTACTAGTCTA
TCAAAGAAGAAGAAACATAGTACTACGTGCCACCGATCCCAAACGCAGACCATGACAGGAGATTAATCAGTCGATCC
GACCGCCAGCCGGAGCCCGGTATCATCATCTCAGGCGATGGGGACGCCGAGGAGGTCGAGCCCCGAGTGGCGACGT
GCTCGTCTTCGCCAAGGGAGTCAACTCGCGATAGGCGTGAACCGCGTGGCCTCCAACATCTGGTGCCTACCGACGT
GGAAAGTAAGAAGAGAGAAAATAGAAGCAAAACCACCTTCAATTCTCTCCAAAACCACCTAGGGTGAGATTTATACG
GTTTTGCAAAGTTTGGGGGGAAAATAATCCGGTTTTGAAGCTGAGGGGGTTATTGATCCATTAAGAAGAATTTGAGG
GGGAAACTATACTTTCTTCTTTCATATTTATTCATTTAGTTTCGTTTTTTTTAGTTTAATTTATTTTTTGATGTGATT
TTTAATTCAATATATAAAAACATCTTACATTATCAACCATACATAGCCTGTTTAAATAACATTTTTCATCACACTCGG
CCTGTTTTTCTTGATGGACCTGAACAACCTTGCTTAAGAAACAAAACCTGGCCCAATAACGGTGAGCTTTTACAAGGTC
TGGCCCGTCATATATGCCGGTGAGAGCCAGTGATTGAGAACTCGATCGGTTCTCGCCGCCGCTACTCGTCGACGCC
CGCGCAATGTCGCTGCTGAGATCCGCGTCGAGCACCTGCGCCAGCGCCGCGCCTACTCGTCGACGCCCGCGCA
GCCGAGCGCAAGGTGGCCATCCTCGGCGCGCGGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGGCGCTGCTCATGAAGCTCAACC
CGCTCGTCTCCTCCCTCTCCCTCTACGACATCGCCGCCACGCCCGGCGTCGCCGCAGACGTCTCCACATCAACACC
CGCGCCCTCGTATGTCGCGCCCTTCTTCTCCTCCCCGCGCCTAACTACGCTCGCTTCGCTAGATCTGTGCGTGA
ATGGTCTGTCTGACCGTGGTGGCGCTGCTCTGTATGCAGGTGAAGGGGTTTCGTCGGGGACGACCAGCTCGGGGAGGC
GCTGGAGGGCGCGGACCTGGTCATCATCCCCGCCGGGGTGCCGCGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCA
AGATCAACGCCGGCATCGTCAAGGGCCTCTGCACCGCCATCGCCAGGCACTGCCCCAACGCTCTCTCTCAACTCTC
TTCGAATTTAGATCTGTTGCTCGCATGGGTGATTGTTCTGGCTACTGTGGGTACGTGGTCTCACTACAGATCTGTCT
AGTTCCTATTTCGAGGCGTTGACATTGCGTAATTATGGTTCGACATGTAGAACTGTAAGCGGACATCGTTTGGTTAT
CAGCGCGAAAGACCAATACTTATCTATCACACGTGTGTTTTCTAGGCGCTTGCAGTTTTGTATCTCCTGTTGGATAG
TGTGGTTCCTTGGTCCATTCAATTTGTCTGTTGCAATGCTACTTGCATTTGAATGTTGTTGTGTATTAGCCTGGACA
AATGAACACTAGGTCAGTGCTACTCTGGATTGTCTCGCTGTTTTCTCTTGAAAGTTACATTTTCTTGTGTCTATAAC
TCTTCAGTGTATATGTATATATTCAGATATTTATTGTCTGTAATATACATACGTTTGTCTACATGCTTGTGAGTTAT
TATCGTATTCTCTATACTGTATGCCATTCAACAAACCCCATTCCTTCAATTTTTCTAACAGGCTGTTAGCTTAAA
TACATAATGTATCCATTTTCAGGGTTGGTTGTGTTGGGAATCGGTATATGATACTTTAAACTGAAGTTCCTCCTT
TGTTACTTATTTTTGTTTGTATGCATCTTCTGTGAATTTGATGTGTTTTTGTATTGTAGGCTCTGTCAATATGAT
CAGCAACCCTGTCAACTCGACTGTCCCAATTGCAGCTGAGGTGTTCAAGAAGGCTGGTACCTATGATGAGAAGAAGC
TGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTTTCGTGCTAAAACATTCTATGCTGGAAAGGCGAACGTGCCAGTTACTGT
ATTAAGATGACATTTCACTTAATTATAGGGGAAATTGAGATTATGTTGTTGGATTTTATGCCTCTGTCTTTCAATC
TGAGTTGTTGCTGTGATCTTTTGCAGGGGTGAATGTTCTGTTGTTGGTGGCCATGCTGGAATCACTATCCTGCCAC
TGTTCTCGCAGGCTGGCATCTTACTGGCTTAACCTGTTTTCTTTTCATTTTCATGTAATAGCAACACAAATTGATGTG
TAAATCTAGCGAAATTGTAAACACATACTGATAACAAAACCTTCGTAGCATAGTTGTATAAACTATTGTGAATGCTGC
TGGCAAGTTGTTTTAGCTAATAAAAATCTATGTTTTGGATAAGAATCAACAGTATGCCTCTCTAGTGCTGCTTATCTT
TCATCTGTCAATCACCGAAACACTATGCAACTAATGTTGTTTTAACTTTATGCTATATCTGCCATATGTTTTACCGC
CAACTTCTCAAGGTAACAACCTCAATTCTTTATATTCGATATAGCTACTCCTGCAAGTAATGCATTGTCCCATGAGG
ACCTTGTGCGCCCTCACAAAGAGGACGCAAGATGGTGGAAACGGAAGTTGTTGAAGCGAAGGCTGGAAAGGGCTCAGCA
ACATTGTGATGGCATATGTTCTATGAACACGCACACAGACTTTCCTAAGCATGTCTCTTTCTGCTAGTTTTATGCT
CTTGAATAAACATGCTATTATCCCTGTGTGTCCATGGTTTTTATAGAATATCAAAGTAGCATATTAGTGTTTATAC
TCTGCAATCAGCATATGACCAACTTTAGTATTCATAACCTATTTGCACTGACTATCTACTGTATTGTACTCCCTCTG
TTCCTAAATATAAGTCTTTTTTAGATATTTCAATACGGACTACATACGGAACAAAATGAGTGAATCTACACTCTAAAA
TATGTCTATATACATCTGTATGTAGTTCTTATTGAAATCTCTGAAAAGACTTATATTTGATGGTATCTTCATAGCTG
TGCTTTACTGCCAAATATGTACATATGTGAATGTGTTTTCCATTCTGTTTATCAGTAGTTACATGTTTCATTCATTGT
ATAAGTGGCCTTTTTTTTTCTTAGTTGTTTCAGTTTGTGTTGGGCCTTCAGCTTTGTGTTTTTCTTCAGCGTGAACTTA
AACATTTGGTTACGTAAATTATGTTGCACCCTGGATTCTGTTTTTTTTGGACTACTGACCTATGTACTAATTGTAG

AGAATATTCTTTACTAAAGAGTTTTTTCATCCCACTATTAATCTTCTGCTTTTGCTTTCATGTGAAATGCATACTTA
 GTTCAGTTATGTCCAACATTTTGTACTCTTCTGCTCATTTTGGCTGGAAATTACCATCTAAAATGAGACAAGCCGTT
 TTGATCTATGTAGATGAGCTCTGTAGCAATCTCTTGTTTTATAGTATCACATTGCTGATCTTAGACTGGACCTCTTT
 TGCATTATTCGGTTTTGGCTGATAAATATTTTTATCTTGTGTTTTTCCAGATATGCTGGTGCAGTTTTTGGAGATGC
 ATGCTTGAAGGGGCTCAACGGAGTTCCTGACATCGTAGAGTGCTCTTTTGTCCAATCAACCGTAACAGAGCTGCCAT
 TCTTTGCCTCCAAGGTGATTTCCCTGTCCCCCGCCCCCAATGTAAAAAAGAAAGAAAGATTTCCCTGTTGTTCTTTCAC
 AGTACACAATCATGTGCCTGCAGATTATTTGTCAAGAGAAAACCTTCATATTCCCCACTCTCTCTTTCTTCTATCAT
 GTTAAGTTGTTAAACAGTCTACCAATTTTTCATCCCTACATGAAATTTGCGTGCCTGCTTATTCCTAGAAATGTTGG
 CATGCTTTTAGCTCTGGAAGCAGGTATCCAAAGTGTAGGTTGCTCTTTTGAGTTGAATCGTGTGGTCTGTACAGGC
 CCGACAACTTATGGTTGATTAGTGAGTTTATGGAGTTATAACGATGGAGCTGGCATAACCAGATTCACAGATTGTG
 CTTTGTTTTACATGATCTAAGCCCGTTTATGAAGCCCGGAAAACATGCCTGTGCTGAATGCTAGTATTCCGCAACCT
 GTTAATTTCCGGTGAGAAGATGGAGACTTGGTGTGCTGAACAATAGTTCTTTTGGCATTGCACAGGTGAGGCTGGGCA
 AGAGCGGAGTGGAGGAAGTGCTTGGGCTTGGCGAGCTGTGCGCGTTGGAGAAGGAGGGGCTGGAGAGCCTCAAGGGC
 GAGCTGCTGTCTTCCATCGAGAAGGGCATCAAGTTTCGCGCAGGAGAGCTAGACGGTGCGGCTTGGGTTTCCAAGCTC
 GACCTACATGCTGGCTACCATCAGATCCGTCTAGCTGAAGGGGAGGAATTCAAGACAACATTTTCAGACACACTCGGG
 GCACTACAAGTTCAGAGTGGTGTCTTTTCGGCCTGACAGGTGGCCACCCTCGTTTCTAGGAGCCATGAACACCACGT
 TCCACCCTCTCCTACGCGTGTGTGTTTTGATTTTTTTTCGATGACATACTGGTCTTCAACAAAACCCTCAAGGACCA
 CACACGTGACCCGAGGCAGGTGCTAGCGCTGTTCAATGGAAAGCCAAGTTGTCTAAGTGCGCTTTCGAGCAGCAGAA
 ACTCTCCTACCTGGGGCATGTCTCAGTGAGCAAGGTTTTGCCACCGAGGCAACTGAAATCAGAGCTGTGGCACAGT
 GGACAACACCAAGGAGGTACCCAGTTTTCTGGGGCTGGCGGGTTACTACTGTGCTTTGTCAAGAACTTCGGAATCA
 TAGCTCGGCCAATTTGCAATCTCCTCAATAAGGGTGTGCCATTTTTCCGGACCACAGCAACTGGGAAAACATTCCAA
 GTTCACAAGCAATAGTTGATCGAAGCACTTGTGCTCGCCCTGCCAGACTTCTCCAAGACCTTCGTTGTGCGAGACGGA
 TGCCAGCGACAAAGGGATCGGAGCAGTCTCAGCAAAACGGGCATCCAATTGCATATATGAGCAAAGCCTTGAGCC
 CGTGGTACCAGAGCCTCTCTACCTATGAAGAGGAATACCTGGCAGTGATCATGGTAGTGGAGCAATGGCGACCGTAC
 CTCCAGCATGATGAATTCGCTATCTCAACAGATCAACACAGCCTGACTCATCTCAACGAGCAGCGCCTAACTACCCC
 ATGGCAGCAGAAGGCTTTTACAAAACCTGTTAGGGCCGCGGTACTCGATTTCGTTACAAGAAAGGGAGCGATAACATCG
 CAGTTGATGCACTGTCGAGGGCTAGCACCTCGGAGATCCTGGTCGTGGTTAGTTTCATGTCAACCTGCTTGGCTTGAG
 GACGTCATCACTAGCTATAACAGCCACCCTCAAGCACAGTGTCTCCTCGAGCAGCTCGCCCTTGAGG

Promotor y Downstream Exón Intrón Start Codon y Stop Codon
 Hipotética proteína

Hipotética proteína ScMDH1 Ailés

MSLLRASQHLRQRRRAYSSTPAQPERKVAILGAAGGIGQPLALLMKLNPLVSSLSLYDIAATPGVAADVSHINTRA
 LVKGFVGGDDQLGEALEGADLVIIIPAGVPRKPGMTRDDLKINAGIVKGLCTAIARHCPNALVNMISNPVNSTVPIAA
 EVFKKAGTYDEKKLFGVTTLDVVRKTFYAGKANVPVTGVNVPVVGGHAGITILPLFSQATPASNALSHEDLVALTK
 RTQDGGTEVVEAKAGKGSATLSMAYAGAVFGDACLKGLNGVPDIVECSFVQSTVTELPFFASKVRLGKSGVEEVLGL
 GELSALEKEGLES�KGELLSSIEKGIKFAQES*

ScMDH1 Riodeva Clon 1

ATGTCGCTGCTGAGATCCGCGTCGCAGCACCTGCGCCAGCGCCGCCGAGCTACTCGTCGACGCCCGCGCAGCCGGA
GCGGAAGGTGGCCATCCTCGGCGCGGCGGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGGCGCTGCTCATGAAGCTCAACCCGCTCG
TCTCCTCCCTCTCCCTCTACGACATCGCCGCCACGCCCGGCGTCGCCGCGAGACGTATCCACATCAACACCCGCGCC
CTCGTGAAGGGGTTCGTGGGGGACGACCAGCTCGGGGAGGCGCTGGAGGGCGCGGACCTCGTCATCATCCCCGCCG
GGTGCCGCGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAAGATCAACGCCGGCATCGTCAAGGGCCTCTGCACCG
CCATCGCCAGGCACTGCCCCAACGCTCTCGTCAATATGATCAGCAACCCTGTCAACTCGACTGTCCCAATTGCAGCT
GAGGTGTTCAAGAAGGCTGGTACCTATGATGAGAAGAAGCTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTTTCGTGCTAA
AACATTCTATGCTGGGAAGGCGAACGTGCCAGTTACTGGGGTGAATGTTTCTGTTGTTGGTGGCCATGCTGGAATCA
CTATCCTGCCACTGTTCTCGCAGGCTACTCCTGCAAGTAATGCATTGTCCCATGAGGACCTTGTCGCCCTCACGAAG
AGGACACAAGATGGTGGAACGGAAGTTGTTGAAGCGAAGGCTGGAAAGGGCTCAGCAACATTGTTCGATGGCATAACG
GGGTGCAGTTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGGCTCAACGGAGTTCCTGACATCGTAGAGTGCTCTTTTGTCCAAT
CAACCGTAACAGAGCTTCCATTCTTTGCCTCCAAGGTGAGGCTGGGCAAGAGCGGAGTGAGGAAGTGCTTGGGCTG
GGCGAGCTGTCGGCGTTGGAGAAGGAGGGGCTGGAGAGCCTCAAGGGCGAGCTGCTGTCTTCCATCGAGAAGGGCAT
CAAGTTCGCGCAGGAGAGCTAG

ScMDH1 Imperial clon2

ATGTCGCTGCTGAGATCCGCGTCGCAGCACCTGCGCCAGCGCCGCCGCGCCTACTCGTCGACGCCCGCGCAGCCGGA
GCGCAAGGTGGCCATTCTCGGCGCGGCGGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGGCGCTGCTCATGAAGCTCAACCCGCTCG
TCTCCTCCCTCTCCCTCTACGACATCGCCGCCACGCCCGGCGTCGCCGCCGACGTCTCCACATCAACACCCGCGCC
CTCGTGAAGGGGTTCGTGGGGGACGACCAGCTCGGGGAGGCGCTGGAGGGCGCGGACCTCGTCATCATCCCCGCCG
GGTGCCGCGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAAGATCAACGCCGGGATCGTCAAGGGCCTCTGCACCG
CCATCGCCAGGCACTGCCCCAACGCTCTCGTCAATATGATCAGCAACCCTGTCAACTCGACTGTCCCAATTGCAGCT
GAGGTGTTCAAGAAGGCTGGTACCTATGATGAGAAGAAGCTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTTTCGTGCTAA
AACATTCTATGCTGGAAAGGCGAACGTGCCAGTTACTGGGGTGAATGTTTCTGTTGTTGGTGGCCATGCTGGAATCA
CTATCCTGCCACTGTTCTCGCAGGCTACTCCTGCAAGTAATGCATTGTCCCATGAGGACCTTGTCGCCCTCACAAAG
AGGACGCAAGATGGTGGAACGGAAGTTGTTGAAGCGAAGGCTGGAAAGGGCTCAGCAACATTGTTCGATGGCATAAC
TGGTGCAGTTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGGCTCAACGGAGTTCCTGACATCGTAGAGTGCTCTTTTGTCCAAT
CAACCGTAACAGAGCTGCCATTCTTTGCCTCCAAGGTGAGGCTGGGCAAGAGCGGAGTGAGGAAGTGCTTGGGCTG
GGCGAGCTGTCGGCGTTGGAGAAGGAGGGGCTGGAGAGCCTCAAGGGCGAGCTGCTGTCTTCCATCGAGAAGGGCAT
CAAGTTCGCGCAGGAGAGCTAG

ScMDH1 Petkus Clon 5

ATGTCGCTGCTGAGATCCGCGTCGCAGCACCTGCGCCAGCGCCGCCGAGCTACTCGTCGACGCCCGCGCAGCCGGA
GCGGAAGGTGGCCATCCTCGGCGCGGCGGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGGCGCTGCTCATGAAGCTCAACCCGCTCG
TCTCCTCCCTCTCCCTCTACGACATCGCCGCCACGCCCGGCGTCGCCACCGACGTCTCCACATCAACACCCGCGCC
CTCGTGAAGGGGTTCGTGGGGGACGACCAGCTCGGGGAGGCGCTGGAGGGCGCGGACCTGGTCATCATCCCCGCCG
GGTGCCGCGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAAGATCAACGCCGGCATCGTCAAGGGCCTCTGCACCG
CCATCGCCAGGCACTGCCCCAACGCTCTCGTCAATATGATCAGCAACCCTGTCAACTCGACTGTCCCAATTGCAGCT
GAGGTGTTCAAGAAGGCTGGTACCTATGATGAGAAGAAGCTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTTTCGTGCTAA
AACATTCTATGCTGGAAAGGCGAACGTGCCAATTACTGGGGTGAATGTTTCTGTTGTTGGTGGCCATGCTGGAATCA
CTATCCTGCCACTGTTCTCGCAGGCTACTCCTGCAAGTAATGCATTGTCCCATGAGGACCTTGTCGCCCTCACAAAG
AGGACGCAAGATGGTGGAACGGAAGTTGTTGAAGCGAAGGCTGGAGAGGGCTCAGCAACATTGTTCGATGGCATAACG
GGGTGCAGTTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGGCTCAACGGAGTTCCTGACATCGTAGAGTGCTCTTTTGTCCAAT
CAACCGTAACAGAGCTGCCATTCTTTGCCTCCAAGGTGAGGCTGGGCAAGAGCGGAGTGAGGAAGTGCTTGGGCTG
GGCGAGCTGTCGGCGTTGGAGAAGGAGGGGCTGGAGAGCCTCAAGGGCGAGCTGCTGTCTTCCATCGAGAAGGGCAT
CAAGTTCGCGCAGGAGAGCTAG

TGGTGCAGTTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGGCTCAACGGAGTTCCTGACATCGTAGAGTGCTCTTTTGTCCAAT
CAACCGTAACAGAGCTGCCATTCTTTGCCTCCAAGGTGAGGCTGGGCAAGAGCGGAGTGGAGGAAGTGCTTGGGCTT
GGCGAGCTGTGGCGTTGGAGAAGGAGGGGCTGGAGAGCCTCAAGGGCGAGCTGCTGTCTTCCATCGAGAAGGGCAT
CAAGTTCGCGCAGGAGAGC**TAG**

Apéndice II.3 Secuencia ADNc del gen *ScMDH2* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuencia de ADNg y del promotor del cultivar Ailés.

***ScMDH2* Ailés clon3**

TTTGATGTCACCTTCAAGGCTGACAGTGAGAAGCCACGTCCGCTCTGGACCGGCATGGATCGACCGCTCTACAATGGCATGA
ATGCAGGCAGCTTGCGCCAGGCGGAAACGCGCGCGGGTGGAGGGTTTATACTAGGCGAGGGTAGTCAGGAGCGGGTGTGGC
AGCGGTCCGGGCGCCCGCTAAACCCAGACTTTTGTCTCCGTTTCGAAAAGAAAAACACGTCCGGACCGACCTGCGGATTAA
TGCATGACTGTTAGATGGCAAAGACGTTTGAACCGTGCAGTCCGGACAATTGCGGATGATTTTGGAGGTGGCCTAATATT
ATAAATTTCTTTTACATCACCTGATATTATAAGGTTTATTGCACACACATGTTTCTTTTACAAGTTTCTTTTTTGAAGG
TAATACTCATATATGAAAAAAATCCCGGAAAAGTTGGATCGGAAATGGTTATCTCGAAACCCCCAAACCCTTTTTTCGTAA
CAACTTTATTGTTTAGATCATCCCATCCATCCACCACTTTGCTGGCTCCGCTCTTCTATACAATAGCAGCACATCAGCACCC
GCCGCCCGTCCACATCTCTCCCTTTCACATCCATCGACCCAGATCTCACAGGCGCCCAAGCCAGCGACGATGAGGTCCTC
GGTGATGAGATCCGCCGCGCCAGCTCCTCCGCCGCGCACTACTCGTCCGCGCCCGGGCAGCAGGCGCGGAAGGTGG
CCATCCTCGGCGCGGCGCGGCATCGGCCAGCCGCTGTCTCTCCTCATGAAGCTGAACCCCTCGTCTCTCTCCCTC
TCCCTCTACGATATCGCGGCCACCCCGGGAGTCGCTGCCGACGTTTCCACATCAACTCCCCTGCCCTGGTACCCCA
CGCTCGTTATCGCCCTCCTCGCGCTGCTCAGTTTCGGTCGGATCTAACACATGGTTTGGGCTTTTCGACAGGTCAAGGGT
TTCATGGCGGACGATCAGCTCGCGGAGGCGTTGGATGGGGCCGACCTGGTGATCATCCCGGCCGCGCTCCCGAGGAA
GCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAACATTAACGCCGGCATCGTTAAGAACCCTCTGCACCGCCATCGCCAAGT
ACTGCCGAATGTAAGACTCTCAACTCTCTTCGAATTTAGATCTGTTGCTCGCATGGGTGATTGTTCTGGCTACTGT
GGGTACGTGGTCTCACTACAGATCTGTCTAGTTTCTATTCGAGGCGTTGACATTGCGTAATTATGGTTCGACATGTA
GAAACTGTAAGCGGACATCGTTTGGTTATCAGCGCGAAAGACCAATACTTATCTATCACACGTGTGTTTTCTAGGCG
CTTGCAGTTTTGTATCTCCTGTTGGATAGTGTGGTTCCTTGGTCCATTTCATTTTGTCTGTTGCAATGCTACTTGCAT
TTGAATGTTGTTGTGTATTAGCCTGGACAAATGAACACTAGGTCAGTGCTACTCTGGATTGTCTCGCTGTTTTCTCT
TGAAAGTTACATTTTCTTGTGTCTATAACTCTTCAGTGTATATGTATATATTCAGATATTTATTGTCGTAATATACA
TACGTTTGTCTTACATGCTTGTGAGTTATTATCGTATTCTCTATACTGTATGCCCATTCACAAACCCCATTCCTTC
AATTTTTCTAACCAGGCTGTTAGCTTAAATACATAATGTATCCATTTTCAGGGTTGGTTGTGTTGGGGAATCGGTAT
ATGATACTTTAAACTGAAGTTTCTCCTTTGTTACTTATTTTTGTTTGTATGCATCTTCTGTGAATTTGATGTGTT
TTTGTATTGTAGGCTCTTGTCAACATGATCAGCAACCCTGTGAATTCAACTGTTCCAATTGCTGCTGAAGTTTTCAA
GAAGGCTGGAACCTATGATGAGAAAAGGTTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTCCGTGCCAGGACTTTCTATG
CTGGGAAGGCTAATGTAGATGTTTCTAGTAAGTGGTAACACTATATGATGTAGTTGACTGGTAGAGAATGAAGAAGA
GTATGGTTGCTGTATTTTTGTCTTTAACTGGAGTGTTTTTTGGCAGCTGTGGACGTTTCTGTGTTGGTGGTCATG
CAGAGTATGGTTGCTGTATTTTTGTCTTTAACTGGAGTGTTTTTTGGCAGCTGTGGACGTTTCTGTGTTGGTGGTC
ATGCTGGTATCACCATCTTGCCACTGTTCTCACAGGTATTGACTTTTGTGATGTAAAAAATGATTTCAGCACCATTTGT
CAACAGTATTCCACATTATAGGGCATAAAACCAGAAATGGGGAGCAGAACTGGATGTTTCATTAGATTCTTATTCAT
GCATTACGCTAGGACTTCCATAGTCAAATCATGCTGAGTAAAGAAATTATGTTTCTCTGCTCAGGTAATGTTTCATCT
ACTTGAAATGTGAAGTGGTGTCTAAACAAAAGATCAAACACATTTTATTCTTCTTGCTCAGTAGCAAAGCATTTG
TGTGGACAACCTGGACATATGAGTGTGTATCTAGTGTGTTGTGTACTGCAAACACCATATTTACCAGAATTATGGAAGTG
AATATGGTCTATCTAGATTTATCTTTCTGGTTGAATAGTGTACATTGGTGCAATCAGCCTAACCCCTAATACCTGAAC
TGAAAGAAACTCTTTTTTGGACAGGCAACTCCTTCAACTAATGCATTGTCTGCTGAAGAAATCAAGGCTCTCACCAAG
AGGACACAGGAGGGTGGGACAGAAGTCGTTGAGGCAAAGGCTGGAAAGGGATCTGCAACCTTGTCCATGGCGTAAGT
AAAATATGAAAAAGCCATGCAAACTGAGGGTGTGTGCCACTTCTTTAGCAACTTAGTGCCATGTTTTTGTCTTCTTC
TGCTAATAAATTGAGTCCACCTTTGTAGGTAATGCTGGTGCAGTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGTCTGAACGGA
GTCCCTGACATTGTTGAATGCTCCTACGTGCAATCGACTGTCAACGAGCTGCCATTCTTTGCTTCCAAGGTACATGT
TTATTTTGTCTATGTGTTATGTTTACCTATGTTTTCAAAGCGGTAAAGCGAAGCGAGGCGCTGGGGGGCGCCTCACTG
CTTAAGCGCTGAAGAGTAAAGCGAGGCGACGCTTTAGACTGATCTGAAGCTAATGGGCAGTAGGAATGTAGGATAGA
TAACCATAGTAAGATACTGATTCATAGACACCACAACTAGACTAAAGTACTGATTCATAGACACCACAACTAGAC
TAAAGTACTGATTCATAGACACCACAACTAGACAAAGTACTGGACTACTACTAGAATAGCACTAAGGAGGGGGAG
GAGCTGTGGCCGGAGAGGAGGAAGCTGGTCCAGATCTGGAGAGGGAGCTGCTGCTAGAGGAGAGAGGAGAGAGCCAG
AGGAGTGGTGGGGGAGGAGCAGGAGCTGCACGTTCTGGTCCCTCTTTTCCCTCCTGTTACTATTACATGTGAGCCC
AGTTTCCCGCCCTTTTGTCTCTGCCAGCCAGTTTTTCCCGCCAAAACCTGTGTTCCCTGCTGGCATGTCTAAA
GCGTCCAGTATGTGCTAAAGCGCCACCAGGACGCCTAAGCGGACGTTTCAGACGCTCTAAACTCTAAGGCGGACGC
CTTAGACACAGAACTAAAGCGAACTGGACGCCTTGAGCCTCGAGGGTGCTCTGACGCTAAACGTCGCTTAAGCGACG

CTTTACAAACAGAGATGTTCACTGCAGTTGTTATCCAGTATATGATTTTCGTGTTGTCAATCTAGATGGTTCCCAATT
TGATTTAGTATCGAAAACATTTCTCTCTAGATATGTGCAGTGGTTGCCTTTTCATGCATACGATTTTATCGTTTATGA
TATGCATGTTGAAAATAGGGTGGTTAAGCGCTGTTTTCTGACTGGCTGGGTTGTTAAATCCTTTTTGATCGTTTGAT
GTTTGTGATGTATTTAATGGTAATTTCTGTTGGACTTCTACGACATTGTTATCTTTGACATATTTTTCTCTGCCTA
GTTCCGATATTACCTTAGAATCGATTGCACTGCAAGTACTGCTGCAAAAACTAGCCTTCGACACGCTTCTTATGTA
TTAGGCCACACACCATTAGTCCATTTCCCCCTTGCACACTGATCAACTTGCTATTTTTGCCACGTTGTATTTTGAT
CGAGACAAAACCTTTTTGAAATGAGGCTCTGCAAGCATCTGCTCAAGTATTCTTACTACTGTGCATTGAATCTGCTAG
AGTATTCAACCAGCTGAATTATGTTCAAGTGAAGTGTCTTTGTGTGATGCTTACTGCCTAAGGCAATGTGATCGA
CTTACTGTATGCTTTGTGGTCTTGCTGTTGTTTGTTCACTTTACAACTGTTCACGCTGGTCATAGAGTGGAATTC
ATGACCCACTGATGTAACACAGGTGAGGCTTGGGAAGAATGGAGTCGAGGAAGTGCTTGGGTTGGGTCAGCTGACGG
AGTTTGAGAAGGAAGGGTTGGAAGCTCTCAAGGGCGAGCTCAAATCTTCAATTGAGAAGGGCGTCGCGTTCGCAAAT
GCAAGTTAGTTAG

Promotor y Downstream Exón Intrón Start Codon y Stop Codon

Hipotética proteína

Hipotética proteína ScMDH2 Ailés

MRSSVMRSAAQLRRRNYSSAPGQQARKVAILGAAGGIGQPLSLLMKNPLVSSLSLYDIAATPGVAADVSHINSPA
LVKGFMAADDQLAEALDGADLVIIPAGVPRKPGMTRDDLFNINAGIVKNLCTAIAKYCPNALVNMISNPVNSTVPIAA
EVFKKAGTYDEKRLFGVTTLDVVRARTFYAGKANVDVSTVDVPVVGGHAGITILPLFSQATPSTNALSAAEIKALTK
RTQEGGTEVVEAKAGKGSATLSMAYAGAVFGDACLKGLNGVPDIVECSYVQSTVTELPFFASKVRLGKNGVEEVLGL
GQLTEFEKEGLEALKGELKSSIEKGVAFANAS*L

ScMDH2 Riodeva Clon5

ATGAGGTCCTCGGTGATGAGATCCGCCGCCAGCTCCTCCGCCGCCGCAACTACTCGTCCGCGCCCGGGCAGCAGGC
GCGGAAGGTGGCCATCCTCGGCGCGGCCGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGTCTCTCCTCATGAAGCTGAACCCCTCG
TCTCCTCCCTCTCCCTCTACGATATCGCGGCCACCCCGGGAGTCGCTGCCGACGTTTCCACATCAACTCCCCTGCC
CTGGTCAAGGGTTTCATGGCGGACGATCAGCTCGCGGAGGCGTTGGATGGGGCCGACCTGGTGATCATCCCGGCCGG
CGTCCCGAGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAACATTAACGCCGGCATCGTTAAGAACCTCTGCACCG
CCATCGCCAAGTACTGCCCCGAATGCTCTTGTCAACATGATCAGCAACCCTGTGAATTCAACTGTTCCAATTGCTGCT
GAAGTTTTCAAGAAGGCTGGAACCTATGATGAGAAAAGGTTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTCCGTGCCAG
GACTTTCTATGCTGGGAAGGCTAATGTAGATGTTTCTACTGTGGACGTTTCTGTTGTTGGTGGTCATGCTGGTATCA
CCATCTTGCCACTGTTCTCACAGGCAACTCCTTCAACTAATGCATTGTCTGCTGAAGAAATCAAGGCTCTCACCAAG
AGGACACAGGAGGGTGGGACAGAAGTCGTTGAGGCAAAGGCTGGAAAGGGATCTGCAACCTTGTCCATGGCGTATGC
TGGTGCAGTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGTCTGAACGGAGTCCCTGACATTGTTGAATGCTCCTACGTGCAAT
CGACTGTCACCGAGCTGCCATTCTTTGCTTCCAAGGTGAGGCTTGGGAAGAATGGGGTCGAGGAAGTGCTTGGGTTG
GGTCAGCTGACGGAGTTTGAGAAGGAAGGTTGGAAGCTCTCAAGGGCGAGCTCAAATCTTCAATTGAGAAGGGCGT
CGCGTTCGCAAATGCAAGTTAGTTAG

ScMDH2 Imperial clones 4 y 6

ATGAGGTCCTCGGTGATGAGATCCGCCGCCAGCTCCTCCGCCGCCGCAACTACTCGTCCGCGCCCGGGCAGCAGGC
GCGGAAGGTGGCCATCCTCGGCGCGGCCGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGTCTCTCCTCATGAAGCTGAACCCCTCG
TCTCCTCCCTCTCCCTCTACGATATCGCGGCCACCCCGGGAGTCGCTGCCGACGTTTCCACATCAACTCCCCTGCC
CTGGTCAAGGGTTTCATGGCGGACGATCAGCTCGCGGAGGCGTTGGATGGGGCCGACCTGGTGATCATCCCGGCCGG
CGTCCCGAGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAACATTAACGCCGGCATCGTTAAGAACCTCTGCACCG
CCATCGCCAAGTACTGCCCCGAATGCTCTTGTCAACATGATCAGCAACCCTGTGAATTCAACTGTTCCAATTGCTGCT
GAAGTTTTCAAGAAGGCTGGAACCTATGATGAGAAAAGGTTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTCCGTGCCAG
GACTTTCTATGCTGGGAAGGCTAATGTAGATGTTTCTACTGTGGACGTTTCTGTTGTTGGTGGTCATGCTGGTATCA
CCATCTTGCCACTGTTCTCACAGGCAACTCCTTCAACTAATGCATTGTCTGCTGAAGAAATCAAGGCTCTCACCAAG
AGGACACAGGAGGGTGGGACAGAAGTCGTTGAGGCAAAGGCTGGAAAGGGATCTGCAACCTTGTCCATGGCGTATGC
TGGTGCAGTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGTCTGAACGGAGTCCCTGACATTGTTGAATGCTCCTACGTGCAAT
CGACTGTCACCGAGCTGCCATTCTTTGCTTCCAAGGTGAGGCTTGGGAAGAATGGAGTCGAGGAAGTGCTTGGGTTG
GGTCAGCTGACGGAGTTTGAGAAGGAAGGTTGGAAGCTCTCAAGGGCGAGCTCAAATCTTCAATTGAGAAAGGCGT
CGCGTTCGCAAATGCAAGTTAGTTAG

ScMDH2 Petkus Clon 5

ATGAGGTCCTCGGTGATGAGATCCGCCGCCAGCTCCTCCGCCGCCGCAACTACTCGTCCGCGCCCGGGCAGCAGGC
GCGGAAGGTGGCCATCCTCGGCGCGGCCGGCGGCATCGGCCAGCCGCTGTCTCTCCTCATGAAGCTGAACCCCTCG
TCTCCTCCCTCTCCCTCTACGATATCGCGGCCACCCCGGGAGTCGCTGCCGACGTTTCCACATCAACTCCCCTGCC
CTGGTCAAGGGTTTCATGGCGGACGATCAGCTCGCGGAGGCGTTGGATGGGGCCGACCTGGTGATCATCCCGGCCGG
CGTCCCGAGGAAGCCCGGCATGACCAGGGACGACCTCTTCAACATTAACGCCGGCATCGTTAAGAACCTCTGCACCG
CCATCGCCAAGTACTGCCCCGAATGCTCTTGTCAACATGATCAGCAACCCTGTGAATTCAACTGTTCCAATTGCTGCT
GAAGTTTTCAAGAAGGCTGGAACCTATGATGAGAAAAGGTTGTTTGGTGTGACCACTCTTGATGTTGTCCGTGCCAG
GACTTTCTATGCTGGGAAGGCTAATGTAGATGTTTCTACTGTGGACGTTTCTGTTGTTGGTGGTCATGCTGGTATCA
CCATCTTGCCACTGTTCTCACAGGCAACTCCTTCAACTAATGCATTGTCTGCTGAAGAAATCAAGGCTCTCACCAAG
AGGACACAGGAGGGTGGGACAGAAGTCGTTGAGGCAAAGGCTGGAAAGGGATCTGCAACCTTGTCCATGGCGTATGC

TGGTGCAGTTTTTTGGAGATGCATGCTTGAAGGGTCTGAACGGAGTCCCTGACATTGTTGAATGCTCCTACGTGCAAT
CGACTGTCACCGAGCTGCCATTCTTTGCTTCCAAGGTGAGGCTTGGGAAGAATGGAGTCAAGGAAGTGCTTGGGTTG
GGTCAGCTGACGGAGTTTGAGAAGGAAGGGTTGGAAGCTCTCAAGGGCGAGCTCAAATCTTCAATTGAGAAGGGCGT
CGCGTTCGCAAATGCAAGTTAGT**TAG**

Apéndice II.4. Secuencia ADNc del gen ScCS para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuenciado ADNg del cultivar Ailés.

ScCS Ailés Clon 1

ATGGCGTTCTTCCGGGGCCTCGCCGCGGTCTCGAGGTTGCGATCCCGTATGGTGAGTGGACCCATCAGAAGCCCCGGGTG
CATTGGGTGGGGATGCGCCCTCTAAGCGTTTGTTAATGCCTTTTTTTTTTTTGGCAGGGGCAGGATGCCACCACGCTTGG
TGGTGTGAGATGGCTGCAGATGCAGAGCGCTTCCGATCTTAAGACAACAATCTTCTGTTCTGTGCTTGAATTTGT
ATAGGATACCGTGAATTGGAAACTGCTGGTGGCTGTTTGATGGCTGGATTTCTGAGAGCGGGATTTTATTTGTTCTGAAC
ATGACGCTGACTGTGTTTCTGAAAATGCATGTGATCTTAGGTCCCAGCTGCAGGAAATGATTCCGGAGCAACAGGTTTGTG
GCTCACTCGTGCATTCTCTTGTAAGTTGGAAAGTATTCGTGGCATCAGATTCCTTATCTTCTCTTTTGTTCACCCCTGTT
ATTTACCCAACCACTGTTAACCCCTTGAGAGTTCATCTGACTCTGTGTCACATCATGCTTAGTCTTCTGGCTCCAAATAGTG
TAGAACACCTTTTATTACAAATGCCATGGTGTAAATGCTAGCAAAATGATAATTGTTGCAAACTAGCATTTAATACCTTG
ACGCCCTTTGAGGAACAAATTTACCTTGTTTCAAATATATTATGCCTGCGTTGCACTAGATTAGAAGATTAACCAATTACGC
TCTTAATATTATTAGTTTCACTAAGTTTAGTTTTGCACTTGAGTTTAAAGAATCAGAATAGCCAGAGCATGTGTTGGAGAG
GTGCTATTTGGATTGCTCCGTCTTCCCCACTCTAACCACTTGTTTTTATGAAAGAATAATTCTGTGCGTTCAAAGTTATTT
CATGCCGATTACATTTTGTACAGGACCGCTTGAAGAACTAAAGTCAGAGCATGGAAGGTCCAGCTTGGAACATAACT
GTGGACATGGTATACATTTAGTACCATTTTCTTTAAAGCTCTGTTTCTGTGCCCCGTCCAAATCTGAACAATGTTTTGT
CTTTCTCCAGGTCTTGGTGGGATGAGAGGGATGACTGGAATGCTCTGGGAGACATCTTTACTTGACCCGGAGGAGGTATC
CTTTTATTGCTCTCCTTTGTAGTGCTATGGGTGCTGTAATAAGAGCAAAATTAATATTAGCTTGCATATCTAGGAATTTTC
TGTGGGTAGAAAATATATTATTTAATTGTCTTGAGATCTCCAGTCAAGTTTCTGTGCCGAAGCTGAGCTTAATCTATCAC
TGTACAGTGGTAATTAGTGTGTTAATTGTATACTTTATGCTGCAGCATGAATCACTTCCAGAATTGACTATAGCACAGTG
ATTTAAAAGATATGTTACGTTTATATTTGATTAAATCATTATACATTTATATTTTAGCATGCCTCCTTCATTGCAGAGTT
TTGATAGAATTAGTCTTAGTTTGGTTTGAGATATTTAAATTTATGCNTCACTGTATATCTCTGTTGATGCCTGTAATTTA
TGTGCTTTCNATTCAGGTATTTCGATTTAGAGGTCTCTCTATTCCAGAGTGCCAGAAAGTCCTGCCGGCTGCAGTTAAAGA
TGGAGAACCTTTACCTGAGGGTCTCCTTTGGCTTCTTTTGACGGGAAAGGTTTGACTTGTTATGAAACATGTACCCCTTTT
TAGTCTAGTAGTCTGTGAAAATAGCTCCTTCGAAAATAGGAGGTATAATTTGTTCAATTGATGTAGTAGAGGACATAACGTC
TTGGTTGACTTTTCTGTTGTAGGTGGGACTTTGTCTATTTTGAGTGTGCCATGTTCTCCCTCTATTTTGTATAAGTGTTC
GCATGCGCTGATTGGTCATTGCTTGTTTCAGGTGCCAACCAAGGAGCAAGTTGATGCTCTATCAAAGGAGTTGCTTAGCCG
TTCCGACTGTTCCAGGTCCCTTATCCCCCTGCTCAGTATCAGTGTTGTACAGTTCATATGTAGCCATAGACGAGCAGAAAG
ATTAGGAAGTCATGTTGCTATCAAATAGTCAAGTTTATTATGTGAGTACACATAAACATTGTCTGAATTTCTAGTATAG
TATAGTTTAAATGGGAAAAGCTGAGGGGGAACCTCCATTTTCTTTGTGAATCGGAATATAAGCTGTTGCTAACTCTTTGAT
GTTTGGTACTGTAGTATTTTGCAAGTATAAGCTGTTATTAACCTCCACTGAAATTTAGCAGTTGAAAGTTAGTATACAAGAT
ATTCCTTTGTTCCAGACCCATTGATGCTTTGCGTTGACAACTTGTGTTTTCTTGGATAGAATAACTTGGATTTTGTGTTAC
TCAATATTGAAATGTTGGTTTTGAGTTTGTGTAATATATTCAATTTACAAATTTTGTGGCAGGGACACTGTAAAGTTGCA
TTGCTTACAAATATTGCTCTGTTTCTCAATTGTGATTTCCTCTCACACGGCTTATTTGACTTGCATGCAGGTATATGCTA
TAAGGCGATAGATGCTCTTCTGTTACTGCTCATCCAATGACACAGTTTACCACAGGAGTGATGGCACTCCAAGT

TGAGAGTGAATTTCAAAGGCGTATGACAAGGGAATGCCCAAACAAAGT

TCTGGGAGCCTACATACGAAGATTGCTTAAATTTGATTGCCCGGCTTCCACAAGTGGCTTCATATGTTTACCGGAGG

ATTTTCAAGGATGGGAAAGCGATTGCAGCTGATAATACACTGGACTATGCAGCGAATTTTTCACACATGCTTGGTTTTGAC
GACCCAAAAATGCTGGAGTTGATGCGCCTATACATAACAATTACAC

TGATCATGAAGGCGGGAATGTCAGTGCTCATAAGGGCATCTGGTAAATATTTTCTTCCCTCCATCGATCTTGAATTATTTT
TCTTGTAGTGTTCCCACCATTTGTCTTGCTTGAAGTGCCTGCTGGCTGCAGTATGGAAATTTGATTTGGC
TGCATCATTGTGCGTATTGTATGTACACAACAGTTTGGCATGCACTGTTGCATCATACTGCTGGTCAAATGTGATT
GTGATTTATCCATGACGCATGTCCGATAAATTAGTTATCATGGTTCCTAGAAAAACACTAGTGACTAGAGAGGGTCGCTTC
ACCAATTGTAGGATAAACATAGTAGTGTGTTTCGAGCATCTAGGAGTATAATTGGAAGAAATGGTTCAATTCAGTTCTTC
GCAAAGTTGTGGTATTGATGGATCTGCTGATGGTACCCTTACTCCTAAATGCGTAGTCATGGATAAAAGTATATGTTTATT
TCTTTCTTCTGGATTATGTGTTGCTGCTAGAAAAAATATGTGTATTTGAGGCATTGAAATCTATTATCTGTGTGCTTGG
GAGAGGCATTGGAAAACACAATACATTGTCGTAATAGGTTAGCTTAAAGGAGATCATCTAAACAGAAGGGTATAATTGACC
TCCCTGTTTTTGAAGTATGTTCTAACGGTAAATAGTACTCCCTCCGTCCATAATGTAAGACGTTTTTTTACACTAGTGTA

GTGTCAAAAAGCGTCTTACATTATGGGACGGAGGGAGTATAAGGTAGCCCCAACTTGTAGTGGATCAAATTGTAGCCTAC
 TTGAAGTGGAGCAGCTTTTGAATCTTTTAATTTAGAGAGACTGTTTTTGGCTGTTCCATATAGGGCCTTTCAATTCTCTGTG
 TTGCTGTTTATGTTCCCTACTAGCTTAGTGTGCTTTGGTTGTTTTACTTGTTTCTATTTATATCCTCTACGCGCACTGAGCT
 GTCGTTTATCCAGAACTAATGGTATTTATTCTGTTACAGGTGGGAAGTGCTCTGTCAGATCCCTACCTTTCTTTTGCAGCG
 GCACTGAACGGTTTGGCTGGGCCACTGCACGGCCTGGCTAATCAGGTACACTTGATTTTATGTGTAGTGGATGTTCTCTGC
 CACATCATGCTCAACTTGTGCTTCAACAAATTGCAAACTCCTTGTGGCCGTGCTATTTGTTACAGTATATGTGGATTGTC
 TAGCCCTTTCCATCAGTTCGGACTTTTGGTTGCGTTGGCTAGTGCAGGAAGCTTAACATGGTATCAGACCTAACGTCTTGA
 TTTCAAGTCCTGCCTTTCTTATTTATCTCAAAAATTGCTCATGCCCCCCTTGTGTCCACGTATTGGCCTTGTGTCCACGT
 ATTTGGCCTCTTGAGTCATACGTGAGTTTCGCGCGCCGTGCTCTCTTCCGGTTGCACGTGTTGACTTGTCTTCCCCGTCAC
 ACGTGAGAGGGGGTGTACAGTATATGTGGTATTCTCTAGCCCTCTCCATCAGTTCGGACTTTTGGTTGCGTTGGCTAGTG
 CATGAAGCTTAACATGGTGTAACTATTTACCCACTTGCTTTTGCATATGACGTTAAGAAGAAGAAAAACATAAGTTCCTG
 TTATTTTAAATGGTGTATTTACTGTTTGGATGTGCATGAAGTACAGTAGTCACCATATACTGCAGGAAGTGTGCTATG
 GATCAAACTCTGTAATGGAAGAAACCGGGAGTAACATTACAACCGACCAACTTAAGGAATATGTATGGAAGACACTGAAGAG
 TGGAAAGGTAGCTTATCTCAAAACGAGTTACATCTATTCAATGAGCAAGCACTATTGTTTATGAGTTTATGGGAAGTTTGC
 ACTGCTAAACTATTCTAGTTGAATGCTGAACAATAGATCTAAGATAATTACCTTCTATTGGATCCTCCTTTCTCCTGGGCT
 GGTTATGAAAATGATTTTCTCTGTTTATCTTTCTTTATTTTACTTTTCTTCATTTGAACTTCAAAAATAAAGGTCTAGATTA
 CTTCCGGTTGCGTTCATAGGTGTTTCCTGGCTATGGTCATGGAGTTCTGCGTAATACAGATCCACGATACTCGTGCCAAAG
 GGAGTTTTCGTTGAAATATTTACCAGAGGACCCACTTTTCCAAGTGGTGTAGTTAAAATCCTTGATCTAACCGCATGGTTTC
 TCTTCAGTTCAACAGTCTCAGTGGGATATATTACTGTTCCCTTTCAGGTCTCCAAGTTGTACGAAGTTGTGCCTCCGATCC
 TCACCGAGTTAGGCAAGGTAATGAGTTTCCAGATTAATCAAAAATTACTCCTTTAATTTAGCTTTCTAGGTATGGATACA
 ATCTTTCTTCTATGCATTTTCAGGTGAAAAACCCATGGCCCAATGTCGATGCTCACAGTGGAGTGTGCTCAACCACTTTG
 GATTAAGTGAAGCACGGTATACTAATTTCTCTTGCTTAAATTATCAATTCACCTAGCAATACGTTTAACATACAGTACAATA
 GAAAACTAGTTTCAGCATCAGTAACGGGTATGCCTTGTCTGATCTTTAGGTACTACACTGTCTTGTTCGGCGTCTCAAGGA
 GCATAGGAATTGGATCTCAGGTTTGTCTCCCTTTCAATTTCCAGATGCTTCTTTCTTTGGTTTTCCATCTGCTAATCTTG
 ATCAATTATTTGTCTCACAGCTCATCTGGGACCGTGCCCTTGGCCTACCGCTTGAAAGACCGAAGAGTGTACCATGGAGT
 GGCTGGAAAACCACTGCAAGAAGGTTGCGGCT

Promotor y Downstream

Exón

Intrón

Start Codon y Stop Codon

Hipotética proteína

Hipotética proteína ScCS Ailés

MAFFRGLAAVSRLRSRMGQDATTGGVRWLQMQSASDLRLSQLQEMIPEQQDRLKKLKSEHGKVQLGNITVDMVLG
 GMRGMTGMLWETSLLDPEEGIRFRGLSIPECQKVLPAAVKDGEPLPEGLLWLLLTKVPTKEQVDALSKELLSRSTV
 PGYVYKAIDALPVTAPMTQFTTGVMALQVESEFQKAYDKGMPKTKFWEPTYEDCLNLIARLPQVASVYVYRRIFKDG
 KAIAADNTLDYAANFSHMLGFDDPKMLELMRLYITIHTDHEGGNVSAHTGHLVGSALSDPYLSFAAALNGLAGPLHG
 LANQEVLWIKSVMEETGSNITTDQLKEYVWVKTLKSGKVVPYGHGVLNRNTPRYSCQREFALKYLPEDPLFQLVSK
 LYEVVPPILTELGVKNPWPNVDAHSGVLLNHFGLTEARYYTVLFGVSRSIGIGSQLIWDRALGLPLERPKSVTMEW
 LENHCKKVAA

ScCS Riodeva Clon 1

ATG GCGTTCTTCCGGGGCCTCGCCGCGGTCTCGAGGTTGCGATCCCGTATGGGGCAGGATGCCACCACGCTTGGTGG
TGTGAGATGGCTGCAGATGCAGAGCGCTTCCGATCTTGATCTTAGGTCCCAGCTGCAGGAAATGATTCCGGAGCAAC
AGGACCGCTTGAAGAACTAAAGTCAGAGTATGGAAAGGTCCAGCTTGGAACATAACTGTGGACATGGTCCTTGGT
GGGATGAGAGGGATGACTGGAATGCTCTGGGAGACATCTTTACTTGACCCGGAGGAGGTATTTCGATTTAGAGGTCT
CTCTATTCCAGAGTGCCAGAAAGTCCTGCCGGCTGCAGTTAAAGATGGAGAACCTTTACCTGAGGGTCTCCTTTGGC
TTCTTTTGACGGGAAAGGTGCCAACCAAGGAGCAAGTTGATGCTCTATCAAAGGAGTTGCTTAGCCGTTTCGACTGTT
CCAGGTTATGTCTATAAGGCGATAGATGCTCTTCCTGTTACTGCTCATCCAATGACACAGTTTACCACAGGAGTGAT
GGCACTCCAAGTTGAGAGTGAATTTCAAAGGCGTATGACAAGGGAATGCCAAAACAAAGTTCTGGGAGCCTACAT
ACGAAGATTGCTTAAATTTGATTGCCCGCTTCCACAAGTGCTTCATATGTTTACCGGAGGATTTTCAAGGATGGG
AAAGCGATTGCAGCTGATAATACTGGACTATGCAGCGAATTTTTCACACATGCTTGGTTTTGATGACCCAAAAAT
GCTGGAGTTGATGCGCCTATACATAACAATTCACACTGATCATGAAGGCGGGAATGTCAGTGCTCATAACAGGGCATC
TGGTTGGAAGTGCTCTGTCAGATCCCTACCTTTCTTTTGACGCGGCACTGAACGGTTTGGCTGGGCCACTGCACGGC
CTGGCTAATCAGGAAGTGTTGCTATGGATCAAATCTGTAATGGAAGAAACCGGGAGTAACATTACAACCGACCAACT
TAAGGAATATGTATGGAAGACACTGAGGAGTGGAAGGTTGTTCTGGCTATGGTCATGGAGTTCTGCGTAATACAG
ATCCACGATACTCGTGCCAAAGGGAGTTTTCGTTGAAATATTTACCAGAGGACCCACTTTTCCAAGTGGTCTCCAAG
TTGTACGAAGTTGTGCCTCCGATCCTCACCAGAGTTAGGCAAGGTGAAAAACCCATGGCCCAATGTCGATGCTCAG
TGGAGTGTTGCTCAACCACTTTGGATTAACTGAAGCACGGTACTACACTGTCTTGTTTCGGCGTCTCAAGGAGCATAG
GAATTGGATCTCAGCTCATCTGGGACCGTGCCCTTGGCCTACCGCTTGAAAGACCGAAGAGTGTCACCATGGAGTGG
CTGGAACCACTGCAAGAAGGTTGCGGCT

ScCS Imperial Clon 1

ATG GCGTTCTTCCGGGGCCTCGCCGCGGTCTCGAGGTTGCGATCCCGTATGGGGCAGGATGCCACCACGCTTGGTGG
TGTGAGATGGCTGCAGATGCAGAGCGCTTCCGATCTTGATCTTAGGTCCCAGCTGCAGGAAATGATTCCGGAGCAAC
AGGACCGCTTGAAGAACTAAAGTCAGAGCATGGAAAGGTCCAGCTTGGAACATAACTGTGGACATGGTCCTTGGT
GGGATGAGAGGGATGACTGGAATGCTTTGGGAGACATCTTTACTTGACCCGGAGGAGGTATTTCGATTTAGAGGTCT
CTCTATTCCAGAGTGCCAGAAAGTCCTGCCGGCTGCAGTTAAAGATGGAGAACCTTTACCTGAGGGTCTCCTTTGGC
TTCTTTTGACGGGAAAGGTGCCAACCAAGGAGCAAGTTGATGCTCTATCAAAGGAGTTGCTTAGCCGTTTCGACTGTT
CCAGGTTATGTCTATAAGGCGATAGATGCTCTTCCTGTTACTGCTCATCCAATGACACAGTTTACCACAGGAGTGAT
GGCACTCCAAGTTGAGAGTGAATTTCAAAGGCGTATGACAAGGGAATGCCAAAACAAAGTTCTGGGAGCCTACAT
ACGAAGATTGCTTAAATTTGATTGCCCGCTTCCACAAGTGCTTCATATGTTTACCGGAGGATTTTCAAGGATGGG
AAAGCGATTGCAGCTGATAATACTGGACTATGCAGCGAATTTTTCACACATGCTTGGTTTTGATGACCCAAAAAT
GCTGGAGTTGATGCGCCTATACATAACAATTCACACTGATCATGAAGGCGGGAATGTCAGTGCTCATAACAGGGCATC
TGGTTGGAAGTGCTCTGTCAGATCCCTACCTTTCTTTTGACGCGGCACTGAACGGTTTGGCTGGGCCACTGCACGGC
CTGGCTAATCAGGAAGTGTTGCTATGGATCAAATCTGTAATGGAAGAAACCGGGAGTAACATTACAACCGACCAACT
TAAGGAATATGTATGGAAGACACTGAAGAGTGGAAGGTTGTTCTGGCTATGGTCATGGAGTTCTGCGTAATACAG
ATCCACGATACTCGTGCCAAAGGGAGTTTTCGTTGAAATATTTACCAGAGGTCCCACTTTTCCAAGTGGTCTCCAAG
TTGTACGAAGTTGTGCCTCCGATCCTCACCAGAGTTAGGCAAGGTGAAAAACCCATGGCCCAATGTCGATGCTCAG
TGGAGTGTTGCTCAACCACTTTGGATTAACTGAAGCACGGTACTACACTGTCTTGTTTCGGCGTCTCAAGGAGCATAG
GAATTGGATCTCAGCTCATCTGGGACCGTGCCCTTGGCCTACCGCTTGAAAGACCGAAGAGTGTCACCATGGAGTGG
CTGGAACCACTGCAAGAAGGTTGTGGCT

ScCS Petkus Clon 2

ATG GCGTTCTTCCGGGGCCTCGCCGCGGTCTCGAGGTTGCGATCCCGTATGGGGCAGGATGCCACCACGCTTGGTGG
TGTGAGATGGCTGCAGATGCAGAGCGCTTCCGATCTTGATCTTAGGTCCCAGCTGCAGGAAATGATTCCGGAGCAAC

AGGACCGCTTGAAGAACTAAAGTCAGAGCATGGAAAGGTCCAGCTTGGAAACATAACTGTGGACATGGTCCTTGGT
GGGATGAGAGGGATGACTGGAATGCTTTGGGAGACATCTTTACTTGACCCGGAGGAGGGTATTCGATTTAGAGGTCT
CTCTATTCCAGAGTGCCAGAAAGTCCTGCCGGCTGCAGTTAAAGATGGAGAACCCTTTACCTGAGGGTCTCCTTTGGC
TTCTTTTGACGGGAAAGGTGCCAACCAAGGAGCAAGTTGATGCTCTATCAAAGGAGTTGCTTAGCCGTTTCGACTGTT
CCAGGTTATGTCTATAAGGCGATAGATGCTCTTCCTGTTACTGCTCATCCAATGACACAGTTTACCACAGGAGTGAT
GGCACTCCAAGTTGAGAGTGAATTTCAAAGGCGTATGACAAGGGAATGCCCCAAACAAAGTTCTGGGAGCCTACAT
ACGAAGATTGCTTAAATTTGATTGCCCGGCTTCCACAAGTGGCTTCATATGTTTACCGGAGGATTTTCAAGGATGGG
AAAGCGATTGCAGCTGATAATACACTGGACTATGCAGCGAATTTTTCACACATGCTTGGTTTTGATGACCCAAAAAT
GCTGGAGTTGATGCGCCTATACATAACAATTCACACTGATCATGAAGGCGGGAATGTCAGTGCTCATACAGGGCATC
TGGTTGGAAGTGCTCTGTCAGATCCCTACCTTTCTTTTGACGCGGCACTGAACGGTTTGGCTGGGCCACTGCACGGC
CTGGCTAATCAGGAAGTGTTGCTATGGATCAAATCTGTAATGGAAGAAACCGGGAGTAACATTACAACCCACCAACT
TAAGGAATATGTATGGAAGACACTGAAGAGTGGAAGGTTGTTCCCTGGCTATGGTCATGGAGTTCTGCGTAATACAG
ATCCACGATACTCGTGCCAAAGGGAGTTGCGTTGAAATATTTACCAGAGGACCCACTTTTCCAAGTGGTCTCCAAG
TTGTACGAAGTTGTGCCTCCGATCCTCACCGAGTTAGGCAAGGTGAAAAACCCATGGCCCAATGTCGATGCTCACAG
TGGAGTGTTGCTCAACCACTTTGGATTAACTGAAGCACGGTACTACACTGTCTTGTTTCGGCGTCTCAAGGAGCATAG
GAATTGGATCTCAGCTCATCTGGGACCGTGCCCTTGGCCTACCGCTTGAAAGACCGAAGAGTGTACCATGGAGTGG
CTGGAACCACTGCAAGAAGGTTGTG**GCT**

II.5. Secuencia ADNc del gen *ScFUM* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva).

ScFUM Ailés

ATG GCGATGGTTCTGCGACGCCTCGCCGGCGCATCAGCCTCGCCGTCGGCGGGCTGCACTGCTGCTCCGGCCGGCGCT
GACCCGCCCCGATCTCCACCGGCTTCCGCGAGGAGCGCGACACGTTGGGCCCCATCCGCGTGCCCAACGACAAGTTGT
GGGGTGCGCAGACGCAGAGATCGCTGCAAAATTTTCGATATTGGCGGGCAGCGCGAGCGGATGCCTGTACCTATCATC
CGCGCCTTTGGCGTGCTAAAAAGTGCGCCGCTAAGGTGAATATGGAGTATGGCCTTGATCCAACAATTGGGAAGGC
AATAATGCAGGCGGCTGAGGAGGTTGCAGAGGGAAAGCTGGACGATCACTTTCCGCTTGTTATCTGGCAAACCTGGCA
GTGGCACGCAAAGCAACATGAATGCCAATGAGGTAATTGCAAAATAGGGCAGCTGAGATACTTGACATAAGCGTGGT
GACAAGTTTGTACACCCTAATGACCATGTGAACAGGTCACAATCCTCGAATGATACATTTCCCACTGTTATGCACAT
AGCAGCAGCTGTAGAGATCAATTCAAGGTTTATCCCAAGTCTGGAGCAGTTGCATAAGTCACCTTCATTCAAAGTCTG
RTGAGTTTAAAGACATTATTAAAATTGGGCGTACACATACCCAAGATGCCACCCCACTGACTCTTGGTCAAGAGTTC
AGTGGTTATGCTACACAGGTGAAATATGGAATTGACCGAATTGCATGTACCTTACCAAGGATGTATCAGCTTGCTCA
AGGTGGGACTGCAGTTGGCACTGGCTTGAACACGAAGAAAGGATTTGATGGCAAAATTGCAGCTGCTGTGGCTGAGG
AAACAGAACTACCTTTTCGTGACAGCAGAGAACAAGTTTGAAGCTTTGGCAGCACATGATGCTTTTGTGAGAGCAGT
GGTGTGTGAACACAATTTCTGCATCTCTTATGAAGATAGCAAATGACATACGCTTGCTGGGAAGTGGCCCTCATTG
TGGACTTGGTGAACCTTATTCTACCAGAAAATGAGCCTGGGAGCAGCATTATGCCTGGAAAAGTTAATCCTACCCAGT
GTGAGGCTCTGACCATGGTTTGTGCTCAGGTTATGGGTAATCATGTCGGTGTTACAATAGGTGGTTCAAATGGGCAT
TTTGAACCTGAACGTTTATAAGCCAATGATTGCTGCTGGATTACTTCGATCATTGAGATTATTAGGGGATGCATCTGT
ATCCTTTGAGAAAACTGTGTCAGGGGAATAGAAGCAAACCATAAGAGAATTTTACAATTGTTGCACGAGTCTTTGA
TGTGGTGACGTCGTTGAACCCCAAAATTGGCTATGACAATGCTGCAGCCGTTGCTAAGAAAGCTCACAAAGAAGGA
ACAACACTGAAGGAAGCTGCTTTAGGCCTTGGAGTCTTGACGGAAAAGGAATTCCATGGACTCGTTGTTCCAGAGAA
AATGATTGGCCCTTCTGATTAA

Hipotética proteína *ScFUM* Ailés

MAMVLRRLAGASASPSAAALLLRPALTRPISTGFREERDTFGPIRVPNDKLWGAQTQRSLQNFDIGGERERMPVPII
RAFGVLKKCAAKVNMEYGLDPTIGKAIMQAAEEVAEGKLDHDFPLVIWQTGSGTQSNMNANEVIANRAAEILGHKRG
DKFVHPNDHVNRSQSSNDTFPTVMHIAAAVEINSRFIPSLQLHKSLSKSKS?EFKDIIKIGRTHQTQDATPLTLGQEF
SGYATQVKYIDRIACTLPRMYQLAQGGTAVGTGLNKKGFDGKIAAAVAEEETELPFVTAENKFEALAAHDAFVSS
GAVNTISASLMKIANDIRLLGSGPHCGLGELILPENEPGSSIMPGKVNPTQCEALTMVCAQVMGNHVGVTIGGSNGH
FELNVYKPMIAAGLLRSLRLLGDASVSFEKNCVRGIEANHKRISQLLHESLMLVTSLNPKIGYDNAAAVAKKAHKEG
TTLKEAALGLGVLTEKEFHGLVVPEKMIGPSD*

ScFUM Riodeva

ATGGCGATGGTTCTGCGACGCCTCGCCGGCGCATCAGCCTCGCCGTCGGCGGGCTGCACTGCTGCTCCGGCCGGCGCT
GACCCGCCCCGATCTCCACCGGCTTCCGCGAGGAGCGCGACACGTCCGGCCCCATCCGCGTGCCCAACGACAAGTTGT
GGGGTGCGCAGACGCAGAGATCGCTGCAAAATTTTCGATATTGGCGGCGAGCGCGAGCGGATGCCTGTACCTATCATC
CGCGCCTTTGGCGTGCTAAAAAGTGCGCCGCTAAGGTGAATATGGAGTATGGCCTTGATCCAACAATTGGGAAGGC
AATAATGCAGGCGGCTGAGGAGGTTGCAGAGGGAAAGCTGGACGATCACTTTCCGCTTGTTATCTGGCAAACCTGGCA
GTGGCACGCAAAGCAACATGAATGCCAATGAGGTAATTGCAAAATAGGGCAGCTGAGATACTTGGACATAAGCGTGGT
GACAAGTTTGTACACCCTAATGACCATGTGAACAGGTCACAATCCTCGAATGATACATTTCCCACTGTTATGCACAT
AGCAGCAGCTGTAGAGATCAATTCAAGGTTTATCCCAAGTCTGGAGCAGTTGCATAAGTCACTTCATTCAAAGTCTG
ATGAGTTTAAAGACATTATTAAAATTGGGCGTACACATACCCAAGATGCCACCCCACTGACTCTTGGTCAAGAGTTC
AGTGGTTATGCTACACAGGTGAAATATGGAATTGACCGAATTGCATGTACCTTACCAAGGATGTATCAGCTTGCTCA
AGGTGGGACTGCAGTTGGCACTGGCTTGAACACGAAGAAAGGATTTGATGGCAAAATTGCAGCTGCTGTGGCTGAGG
AAACAGAACTACCTTTTCGTGACAGCAGAGAACAAGTTTGAAGCTTTGGCAGCACATGATGCTTTTGTGTGAGAGCAGT
GGTGCTGTGAACACAATTTCTGCATCTCTTATGAAGATAGCAAATGACATACGCTTGCTGGGAAGTGGCCCTCGTTG
TGGACTTGGTGAACCTATTCTACCAGAAAATGGGCCTGGGAGCAGCATTATGCCTGGAAAAGTTAATCCTACCCAGT
GTGAGGCTCTGACCATGGTTTGTGCTCAGGTTATGGGTAATCATGTCGGTGTTACAATAGGTGGTTCAAATGGGCAT
TTTGAACCTGAACGTTTATAAGCCAATGATTGCTGCTGGATTACTTCGATCATTGAGATTATTAGGGGATGCATCTGT
ATCCTTTGAGAAAACTGTGTGACGGGAATAGAAGCAAACCATAAGAGAATTTCACAATTGTTGCACGAGTCTTTGA
TGTTGGTGACGTCGTTGAACCCCAAATTTGGCTATGACAATGCTGCAGCCGTTGCTAAGAAAGCTCACAAAGAAGGA
ACAACACTGAAGGAAGCTGCTTTAAGCCTTGGAGTCTTGACGGAAAAGGAATTCCATGAACTCGTTGTTCCAGAGAA
AATGATTGGCCCTTCTGAT**TAA**

ScFUM Imperial

ATGGCGATGGTTCTGCGACGCCTCGCCGGCGCATCAGCCTCGCCGTCGGCGGGCTGCACTGCTGCTCCGGCCGGCGCT
GACCCGCCCCGATCTCCACCGGCTTCCGCGAGGAGCGCGACACGTTCGGCCCCATCCGCGTGCCCAACGACAAGTTGT
GGGGTGCGCAGACGCAGAGATCGCTGCAAAATTTTCGATATTGGCGGCGAGCGCGAGCGGATGCCTGTACCTATCATC
CGCGCCTTTGGCGTGCTAAAAAGTGCGCCGCTAAGGTGAATATGGAGTATGGCCTTGATCCAACAATTGGGAAGGC
AATAATGCAGGCGGCTGAGGAGGTTGCAGAGGGAAAGCTGGACGATCACTTTCCGCTTGTTATCTGGCAAACCTGGCA
GTGGCACGCAAAGCAACATGAATGCCAATGAGGTAATTGCAAAATAGGGCAGCTGAGATACTTGGACATAAGCGTGGT
GACAAGTTTGTACACCCTAATGACCATGTGAACAGGTCACAATCCTCGAATGATACATTTCCCACTGTTATGCACAT
AGCAGCAGCTGTAGAGATCAATTCAAGGTTTATCCCAAGTCTGGAGCAGTTGCATAAGTCACTTCATTCAAAGTCTG
ATGAGTTTAAAGACATTATTAAAATTGGGCGTACACATACCCAAGATGCCACCCCACTGACTCTTGGTCAAGAGTTC
AGTGGTTATGCTACACAGGTGAAATATGGAATTGACCGAATTGCATGTACCTTACCAAGGATGTATCAGCTTGCTCA
AGGTGGGACTGCAGTTGGCACTGGCTTGAACACGAAGAAAGGATTTGATGGCAAAATTGCAGCTGCTGTGGCTGAGG
AAACAGAACTACCTTTTCGTGACAGCAGAGAACAAGTTTGAAGCTTTGGCAGCACATGATGCTTTTGTGTGAGAGCAGT
GGTGCTGTGAACACAATTTCTGCATCTCTTATGAAGATAGCAAATGACATACGCTTGCTGGGAAGTGGCCCTCGTTG
TGGACTTGGTGAACCTATTCTACCAGAAAATGAGCCTGGGAGCAGCATTATGCCTGGAAAAGTTAATCCTACCCAGT
GTGAGGCTCTGACCATGGTTTGTGCTCAGGTTATGGGTAATCATGTCGGTGTTACAATAGGTGGTTCAAATGGGCAT
TTTGAACCTGAACGTTTATAAGCCAATGATTGCTGCTGGATTACTTCGATCATTGAGATTATTAGGGGATGCATCTGT
ATCCTTTGAGAAAACTGTGTGACGGGAATAGAAGCAAACCATAAGAGAATTTCACAATTGTTGCACGAGTCTTTGA
TGTTGGTGACGTCGTTGAACCCCAAATTTGGCTATGACAATGCTGCAGCCGTTGCTAAGAAAGCTCACAAAGAAGGA
ACAACACTGAAGGAAGCTGCTTTAAGCCTTGGAGTCTTGACGGAAAAGGAATTCCATGAACTCGTTGTTCCAGAGAA
AATGATTGGCCCTTCTGAT**TAA**

ScFUM Petkus

ATG GCGATGGTTCTGCGACGCCTCGCCGGCGCATCAGCCTCGCCGTCGGCGGGCTGCACTGCTGCTCCGGCCGGCGCT
GACCCGCCCCGATCTCCACCGGCTTCCGCGAGGAGCGCGACACGTTGGGCCCCATCCGCGTGCCCAACGACAAGTTGT
GGGGTGCGCAGACGCAGAGATCGCTGCAAAATTTTCGATATTGGCGGCGAGCGCGAGCGGATGCCTGTACCTATCATC
CGCGCCTTTGGCGTGCTAAAAAGTGCGCCGCTAAGGTGAATATGGAGTATGGCCTTGATCCAACAATTGGGAAGGC
AATAATGCAGGCGGCTGAGGAGGTTGCAGAGGGAAAGCTGGACGATCACTTTCCGCTTGTTATCTGGCAAACCTGGCA
GTGGCACGCAAAGCAACATGAATGCCAATGAGGTAATTGCAAAATAGGGCAGCTGAGATACTTGGACATAAGCGTGGT
GACAAGTTTGTACACCCTAATGACCATGTGAACAGGTCACAATCCTCGAATGATACATTTCCCACTGTTATGCACAT
AGCAGCAGCTGTAGAGATCAATTCAAGGTTTATCCCAAGTCTGGAGCAGTTGCATAAGTCACTTCATTCAAAGTCTG
ATGAGTTTAAAGACATTATTAAAATTGGGCGTACACATACCCAAGATGCCACCCCACTGACTCTTGGTCAAGAGTTC
AGTGGTTATGCTACACAGGTGAAATATGGAATTGACCGAATTGCATGTACCTTACCAAGGATGTATCAGCTTGCTCA
AGGTGGGACTGCAGTTGGCACTGGCTTGAACACGAAGAAAGGATTTGATGGCAAAATTGCAGCTGCTGTGGCTGAGG
AAACAGAACTACCTTTCGTGACAGCAGAGAACAAGTTTGAAGCTTTGGCAGCACATGATGCTTTTGTGTGAGAGCAGT
GGTGCTGTGAACACAATTTCTGCATCTCTTATGAAGATAGCAAATGACATACGCTTGCTGGGAAGTGGCCCTCGTTG
TGGACTTGGTGAACCTTATTCTACCAGAAAATGAGCCTGGGAGCAGCATTATGCCTGGAAAAGTTAATCCTACCCAGT
GTGAGGCTCTGACCATGGTTTGTGCTCAGGTTATGGGTAATCATGTCGGTGTTACAATAGGTGGTTCAAATGGGCAT
TTTGAACCTGAACGTTTATAAGCCAATGATTGCTGCTGGATTACTTCGATCATTGAGATTATTAGGGGATGCATCTGT
ATCCTTTGAGAAAACTGTGTCAGGGGAATAGAAGCAAACCATAAGAGAATTTCAACAATTGTTGCACGAGTCTTTGA
TGTGGTGACGTCGTTGAACCCCCAAAATTGGCTATGACAATGCTGCAGCCGTTGCTAAGAAAGCTCACAAAGAAGGA
ACAACACTGAAGGAAGCTGCTTTAAGCCTTGGAGTCTTGACGGAAAAGGAATTCCATGAACTCGTTGTTCCAGAGAA
AATGATTGGCCCTTCTGATTAA

II.6. Secuencia ADNc del gen *ScPME* para cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva) y secuencia de ADNg, del promotor y *downstream* de cuatro cultivares (Ailés, Imperial, Petkus y Riodeva).

ScPME Ailés

TCTTTACATGTCTACCGCCCAAAACAGCTCTCTGATTAGTGTTTCATTCATCCCAAAAAGATCGGCTGCTTAAATGGACTG
CATGTGCGATTTTCTTTTGGAGAGACGAGCATGACCGATTTTAGAAAAGCAGACATACAATGACCAGTCAGCGGGGAAGAAA
CAGATAAGAACTCTACGAAGAATGTCACCCCATGACCAGGCCAACGCGATCCCTAAATAGGCACTGCTCTTCTGTACGTC
AACCACCTGCGGACAGGACATGCCGAAAACAGCGCTCGAGCCAAGAATTCCCTTGCCACGGCCATGCATCCTTCCATTATA
AATTGTGCTTTCCCTTCAATCCCTCAGCAACCTTTCTCGCCGGCCGAAATGGCAAATAACTTCCTCCTCGGAGGCCTGGGG
GCAATCCTTGTCGTCGCGGTGCTGGGAGTAGTCGCCACCGTGACCACCTCCGGCAATAATAAGCCGGCGACAACCTTC
AATGTCCCGGGTGAGGCCACCTTGCCACCTCCGGCAAGTCGGTCAAGTCTCTGTGCGCCCCACGCTGTACAAGGAGTCG
TGCGAGAAGACCCTCACCTCGGCCCTCCAATGGCACCAGAGAACCCCAAGAGGTCTTCGCCACCGTTGCCAAGTCGGCGATG
GAGTCCATCAAGTCGGCGGTGGAGCGGTCCCGAACTATCGGCGAGGCCAAGTCGAGCGACCCCTTGACGGAGGGCGCGCGC
CAGGACTGCAAGGAGCTCCTGGAGGACTCCGTGGACGACCTCAAGGGCATGGTCGAGATGGCCGGCGGCGACATCAAGGTG
CTCCTTAGCCGACCGACGACCTCGAGCACCAGGATCACCGGCGTCATGACCTTCATCGACACCTGCGCCGATGGCTTCGCC
GACGAGAAGCTCAAGGCGGACATGCAGGGCATCCTGCGCAACGCCACGGAGCTCAGCAGCAACGCGCTCGCCATCACCAC
AGCCTCGGCGCCATCTTCAAGAAGCTTGACCTCGACGTGTTCAAGACCGACTCGCGCCGCCGCTCTTGTCTGCGGGGGAG
TCCAAGTACCCCGCGTGGATGAAGGCTCCAGAAAGGAAGCTACTGGCCTCCGGTGGCTTGCCAGCGCCGAACGCGGTTGTG
GCCAAGGACGGCAGCGGGCAGTTCAAGACCATCCAGGATGCCGTGAACTCCATGCCCAAGGGTCACCCGGGCGCGGTACGTC
ATCTACGTCAAGGCTGGGGTCTACGAAGAGATGGTCATGGTCCCCAAGGACAAGGTGAACATATTTCATGTACGGCGACGGC
CCCCAAGCAAAGCCGCGTCACCGGCAGCAAGAGCTTCGCCGACGGCATCACCACCATGAAGACCGCCACCCCTCTGTGAGCCCC
TAGCTATAGCTAAGCTAGTATTTGGTGCAGCAGCAGTAAGGTTCAGGTTGCACAGGGCAATGCAGGTAGTAATTAACAAGTA
CGTATCTTGTCTGCTGCATGCTGCAGCCATTGAGGCGGCCGGGTTTCATCTGCAAGGACATGGGGTTCCACAACACGGCCGG
CGCGGAGAAGCACCAGGCGGTGGCGCTGAGGGTGCAGGGCGACCTCTCGGCCCTTCTTCAACTGCCGGTTCGACGCGTTCCA
GGACACGCTGTACGTGCACGCCCCGGCGCCAGTTCTTCCGCAACTGCGTCATCTCCGGCACCATCGACTTCATCTTCGGCAA
CTCGGCCCGCGTCTTCCAGAACTGCCTCATCATCACGCGCCGGCCCATGGACAACCAGCAGAACTCGGTGACCGCGCACGG
CCGACAGGACCCCAACATGAAGTCCGGGCTGGTGATCCAGAACTGCCGCTGGTGCCGGACCAGAAGCTGTTTCGCGGACCG
CTTCAAGATCCCGTCTACCTGGGCGCGCGTGGAAAGGAGTTCTCGCGGCTGGTCATCATGGAGAGCATGATCGCCGACTT
CATCAAGCCCCGAGGGGTACATGCCGTGGAACGGCGACTTCGGGCTCAAGACGCTCTACTACGCCGAGTTCGGCAACCGCGG
CCCCGGCGCCGGCACCAGCAAGAGGGTCACCTGGCCGGGGTTCCGCGTCATCGGGAGGAAGGAGGCCGAGCAGTTCACCGC
AGGGCCCTTCATCGACGGTGCGACATGGCTCAAGTTCACCGGCACGCCCAACTACCTCGGGTTCAAGGTCATAACGCGCAT
GCATGCATGCAACGCCTGCGCCCTCCTGTACATGAGATACGAGTCGATCGAGGTAACGTAATGTGTGTACGGAACGTGTGA
TGACTGATACTTGCAAGATCAGCTAACCTTCGCTGCTCCGTTATCACCTTCTGTTCTTTTCTGTGGTTTGTCTTGGAGTT
CTCTTTTCTTGGTAAATGATTAAGTGTATGCTGTGACATTGATTAAGTGGAAAATGTATCATTCAAATGCCCATTAAGT
CGTCTGCGTTTGCTACTACTCCACTATTTTATGCTCACGCATGTTTGCTACACATCTGAACTTGTTATTTTGGACTACGTA
GTAGTATACGTGACAGCACCAGGCGAGGAGGACTGACCGAACCTCTCCAATAATCTCCATGTACGCATTATCTTGTGTCT
AACCCGGGTCAAAACAAACTTCCAAAGCAAGCTAGCATTTACGCTCACCAAATTATCATGCGCTCCGGCCTGGCATTCAA
CCATCCCCTAATGCGTGACGTCCGGCCGGACGCGGCAAGGTGATTACAACTGCAATGAACTGGAATTAATAGAGGAAAGA
GCCGCGGATCAGGCCCGATACGTGTCACTTCTCACTATGCACGTATGATACCAGCCCGGGCGCTCG

Promotor y Downstream Exón Intrón Start Codon y Stop Codon Hipotética proteína

Hipotética proteína *ScPME*

MANNFLLGGLGAILVVAVVVGVVATVTTSGNNKAGDNFNPGEATLATSGKSVKSLCAPTLYKESCEKTLTSASNGT
ENPKEVFATVAKSAMESIKSAVERSRTIGEAKSSDPLTEGARQDCKELLEDSDVDDLKGMVEMAGGDIKVLRSRTDDL
EHRITGVMTFIDTCADGFADEKLKADMQGILRNATELSSNALAITNSLGAIFFKKLDLDVFKTDSRRRLLSAGESKYP
AWMKAPERKLLASGGLPAPNAVVAKDGSQFKTIQDAVNSMPKGHPGRYVIYVKAGVYEEMVMVPKDKVNIIFYGDD

PKQSRVTGSKSFADGITTMKTATLSIEAAGFICKDMGFHNTAGAEKHQAVLRVQGDLSAFFNCRFDAFQDITLYVHA
RRQFFRNCVISGTIDFIFGNSAAVFQNCIIITRRPMDNQNSVTAHGRTPDNMKSGLVIQNCRLVPDQKLFADRFKI
PSYLGRPWKFEFSRLVIMESMIADFIKPEGYMPWNGDFGLKTLYYAEFGNRGPGAGTSKRVTWPGFRVIGRKEAEQFT
AGPFIDGATWLKFTGTPNYLGFVKV

ScPME Riodeva Clon1

GCTTAAATGGACTGCATGTCGCATTTTCTTTTTGAAAGACGAGCATGACCGATTTTAGAAAGCAGACATACAATGAC
CAGTCAGCGGGGAAGAAACAGATAAGAACTCTACGAAGAATGTACCCCCATTGACCAGGCCAACGCGATCCCTAAAT
AGGCACTGCTCTTCTGTACGTCAACCACCTGCGGACAGGACATGCCGCAAACAGCGCTCGAGCCAAGAATTCCCTTG
CCACGGCCATGCATCCTTCCATTATAAATTGTGCTTTCCCTTCAATCCCTCAGCAACCTTTCTCGCCGGCCGAAATG
GCAAATAACTTCCTCCTCGGAGGCCCTGGGGCAATCCTTGTCGTCGCGGTGCTGGTGGGCGTAGTCGCCACCGTGAC
CACCTCCGGCAATAATAAGGCCGGCGACAACCTTCAATGTCCCGGTGAGGCCACCCTTGCCACCTCCGGCAAGTCGG
TCAAGTCTCTGTGCGCCCCACGCTGTACAAGGAGTCGTGCGAGAAGACCCTCACCTCGGCCTCCAATGGCACCGAG
AACCCCAAAGAGGTCTTCGCCACCGTTGCCAAGTCCGCGATGGAGTCGATCAAGTCCGCGGTGGAGCGGTCCCGCAC
TATCGGCGAGGCCAAGTCGAGCGACCCCTTGACGGAGGGCGCGCGCCAGGACTGCAAGGAGCTCCTGGAGGACTCCG
TGGACGATCTCAAGGGCATGGTCGAGATGGCCGGCGGCGACATCAAGGTGCTCCTTAGCCGCACCGACGACCTCGAG
CACTGGATCACCGGCGTCATGACCTTCATCGACACCTGCGCCGATGGCTTCGCCGACGAGAAGCCCAAGGCAGACAT
GCAGGGCATCCTGCGCAACGCCACGGAGCTCAGCAGCAACGCGCTCGCCATCACCAACAGCCTCGGCGCCATCTTCA
AGAAGCTTGACCTCGACGTGTTCAAGACCGACTCGCGCCGCCGCTCTTGCTGCGGGGGAGTCCAAGTACCCCGCG
TGGATGAAGGCTCCAGAAAGGAAGCTACTGGCCTCCGGTGGCTTGCCAGCGCCGAACGCGGTTGTGGCCAAGGACGG
CAGCGGCAAATTCAAGACCATCCAGGATGCCGTGAATCCATGCCAAGGGTCACCCGGGCGCGGTACGTCATCTACG
TCAAGGCTGGGGTCTACGAAGAGATGGTCATGGTCCCCAAGGACAAGGTGAACATATTCATGTACGGCGACGGCCCC
AAGCAAAGCCGCGTCACCGGCAGCAAGAGCTTCGCCGACGGCATCACCACCATGAAGACCGCCACCTTCTGTGAGCC
CTAGCTATAGCTAGCTAGTATTTGGTGCAGCAGGTAAGGTTAGGTTGCACAGGGCAATGCAGGTAGTAATTAACA
AGTACGTATCTTGCTGCTGCATGCTGCAGCCATTGAGGCGGCCGGGTTTCATCTGCAAGAACATGGGGTTCCACAAC
ACGGCCGGCGCGGAGAAGCACCAGGCGGTGGCGCTGAGGGTGCAGGGCGACCTCTCGGCCTTCTTCAACTGCCGGTT
CGACGCGTTCCAGGACACGCTGTACGTGCACGCCCGGCGCCAGTTCTTCCGCAACTGCGTCATCTCCGGCACCATCG
ACTTCATCTTCGGCAACTCGGCCGCCGTCTTCCAGAACTGCCTCATCATCACGCGCCGGCCCATGGACAACCAGCAG
AACTCGGTGACCGCGCACGGCCGCACGGACCCCAACATGAAATCCGGGCTGGTGATCCAGAACTGCCGCCTGGTGCC
GGACCAGAAGCTGTTTCGCGGACCGCTTCAAGATCCCGTCTACCTGGGCGCGCCGTGGAAGGAGTTCTCGCGGCTGG
TCATCATGGAGAGCATGATCGCCGACTTCATCAAGCCGAGGGGTACATGCCGTGGAACGGCGACTTCGGGCTCAAG
ACGCTCTACTACGCCGAGTTTCGGCAACCGCGGCCCGGCGCCGACCAGCAAGAGGGTCACCTGGCCGGGGTTCCG
CGTCATCGGGAGGGAGGAGGCCGAGCAGTTACCGCAGGGCCCTTCATCGACGGTGCGACATGGCTCAAGTTCACCG
GCACGCCCAACTACCTCGGGTTCAAGGCTTAACGCGCTGCGCCCTCCTGTACATGAGATACGAGTCGATCGAGGTAA
CGTAATGTGTGTACGGAACGTGTGATGACTGATACTTGCAAGATCATCTAACCTTCGCTGCTCCGTTATCACCTTCT
GTTCTTTTCTGTGGTTTGTCTTCTGGAGTTCTCTTTTCTTGGTAAGTGATTAAGTGTATGTTGTGACATCGATTAAC
TGGAAAATGTATCATTCAGATGCCCATTAAGTGCATCTGCGTTTGCTACTACTCCACTATTTTATGCTCATGCATGT
TTGCTACACATCTGAACTTGTTATTTTGGACTACGTAGTAGTATACGTGACAGCACCGAGGCAGAAGGGACTGACCG
AACCTCTCCAATAATCTCCATGTACGCATTATCTTGTGTCTAACCCGGGTCAAAACAACTTCCAAGCAAGCTAGC
ATTTACGCCTCACCAAATTATCATGCATGCGCTCCGGCCTGGCATTCAACCATCCCCTAATGCGTGACGTCCGGCCG
GACGCGGCAGGGTGATTACAACTGCAATGAACTGGAATTAATAGAGGAAAGAGCCCGCGATCAGGCCCGATACGTG

T

ScPME Imperial Clon8

TCTTTACATGTCTACCGCCCCAAAACAGCTCTCTGATTTGTGTTTCATTCATCCCCAAAAGATCGGCTGCTTAAATGGACTG
CATGTGCGCATTTTCTTTTTGAGAGACGAGCAGCAGCCGATTTTAGAAAAGCAGACATACAATGACCAGTCAGCGGGGAAGAAA
CAGATAAGAACTCTACGAAGAATGTCAACCCATTGACCAGGCCAACCGGATCCCTAAATAGGCACTGCTCTTCTGTACGTC
AACCACCTGCGGACAGGACATGCCGCAAACAGCGCTCGAGCCAAGAATTCCCTTGCCACGGCCATGCATCCTTCCATTATA
AATTGTGCTTTCCCTTCAATCCCTCAGCAACCTTTCTCGCCGGCCGAAATGCGCAAATAACTTCCTCCTCGGAGGCCTGGGG
GCAATCCTTGTCGTCGCGGTCTGTTGGTGGGCGTAGTCGCCACCGTGACCACCTCCGGCAATAATAAGGCCGGCGACAACCTT
AATGTCCCGGGTGAGGCCACCTTGCCACCTCCGGCAAGTCGGTCAAGTCTCTGTGCGCCCCACGCTGTACAAGGAGTCG
TGCGAGAAGACCTCACCTCGGCCTCCAATGGCACCAGAGAACCCCAAAGAGGTCTTCGCCACCGTTGCCAAGTCGGCGATG
GAGTCCATCAAGTCGGCGGTGGAGCGGTCCCGAACTATCGGCGAGGCCAAGTCGAGCGACCCCTTGACGGAGGGCGCGCGC
CAGGACTGCAAGGAGCTCCTGGAGGACTCCGTGGACGACCTCAAGGGCATGGTCGAGATGGCCGGCGGCGACATCAAGGTG
CTCCTTAGCCGCACCGACGACCTCGAGCACTGGATCACCGGCGTCATGACCTTCATCGACACCTGCGCCGATGGCTTCGCC
GACGAGAAGCTCAAGGCGGACATGCAGGGCATCCTGCGCAACGCCACGGAGCTCAGCAGCAACCGGCTCGCCATCACCAAC
AGCCTCGGCGCCATCTTCAAGAAGCTTGACCTCGACGTGTTCAAGACCGACTCGCGCCGCCGCTCTTGCTCTGCGGGGGAG
TCCAAGTACCCCGCGTGGATGAAGGCTCCAGAAAGGAAGCTACTGGCCTCCGGTGGCTTGCCAGCGCCGAACGCGGTTGTG
GCCAAAGACGGCAGCGGTAAATTCAAGACCATCCAGGATGCCGTGAACCTCCATGCCCAGGGGTACCCGGGCGCGGTACGTC
ATCTACGTCAAGGCTGGGGTCTACGAAGAGATGGTCATGGTCCCCAAGGACAAGGTGAACATATTATGTACGGCGACGGC
CCCCAAGCAAAGCCGCGTCACCGGAAGCAAGAGCTTCGCCGACGGCATCACCACTGAAGACCGCCACCTTCTGTGAGCCC
TAGCTATAGCTAAGCTAGTATTTGGTGCAGCAGAGTAAGGTGAGGTTGCACAGGGCAATGCAGGTAGTAATTAACAAGTA
CGTATCTTGTCTGCTGCATGCTGCAGCCATTGAGGCGGCCGGGTTTCATCTGCAAGAACATGGGGTTCCACAACACGGCCGG
CGCGGAGAAGCACACGCGGTAGCGCTGAGGGTGCAGGGCGACCTCTCGGCCTTCTTCAACTGCCGGTTTCGACGCGTTCCA
GGACACGCTGTACGTGCACGCCCCGGCGCCAGTTCTTCCGCAACTGCGTCATCTCCGGCACCATCGACTTCATCTTCGGCAA
CTCGGCCCGCGTCTTCCAGAACTGCCTCATCATCACGCGCCGGCCCATGGACAACCAGCAGAACTCGGTGACCGCGCACGG
CCGACAGGACCCCAACATGAAGTCCGGGCTGGTGATCCAGAACTGCCGCTGGTGCCGGACCAGAAGCTGTTTCGGGACCG
CTTCAAGATCCCGTCTTACCTGGGCGGCCGTGGAAGGAGTTCTCGCGGCTGGTCATCATGGAGAGCATGATCGCCGACTT
CATCAAGCCCGAGGGGTACATGCCGTGGAACGGCGACTTCGGGCTCAAGACGCTCTACTACGCCGAGTTTCGGCAACCGCGG
CCCCGGCGCCGGCACACAGCAAGAGGGTCACCTGGCCGGGGTTCCGCGTCATCGGGAGGAAGGAGGCCGAGCAGTTACCGC
AGGGCCCTTCATCGACAGTGCAGCATGGCTCAAGTTCACCGGCACGCCCAACTACCTCGGGTTCAAGGTCTAAACGCCTGC
GCCCTCCTGTACATGAGATACGAGTCGATCGAGGTAACGTAATGTGTGTACGGAACGTGTGATGACTGATACTTGCAAGAT
CAGCTAACCTTCGCTGCTCCGTTATCACCTTCTGTTCTTTTCTGTGGTTTGTCTGGAGTTCTCTTTTCCCTTGGTAAATG
ATTAAGTGTATGTTGTGACATCGATTAACCTGGAAAATATATCATTCAGATGCCATTAACTGCGTCTGCGTTTGCTACTAC
TCCACTATTTTATGCTCATGCATGTTTGCTACACATCTGAACCTGTTATTTTGGACTACGTAGTAGTATACGTGACAGCAC
CGAGGCAGAAGGGACTGACCGAACCTCTCCAATAATCTCCACGTACGCATTATCTTGTGTCTAACCCGGGTCAAACAAC
TTCAAAGCAAGCTAGCATTTACGCCTCACCAATATCATGCATGCGCTCCGGCCTGAAATTCAACCATCCCCTAATGCG
TGACGTCCGGCCGGACGCGGCAGGGTGATTACAACTGCAATGAACCTGGAATTAATAGAGGAAAGAGCCGCCGATCAGGCC
CGATACGTGT

ScPME Petkus

TTTACATGTCTACCGCCCCAAAACAGCTCTCTGATTAGTGTTCATTCATCCCCAAAAGATCGGCTGCTTAAATGGACTGCA
TGTCGCATTTTCTTTTTGAGAGACGAGCATGACCGATTTTAGAAAAGCAGACATACAATGACCAGTCAGCGGGGAAGAAACA
GATAAGAACTCTACGAAGAATGTCAACCCATTGACCAGGCCAACCGGATCCCTAAATAGGCACTGCTCTTCTGTACGTCAA
CCACCTGCGGACAGGACATGCCGCAAACAGCGCTCGAGCCAAGAATTCCCTTGCCACGGCCATGCATCCTTCCATTATAAA
TTGTGCTTTCCCTTCAATCCCTCAGCAACCTTTCTCGCCGGCCGAAATGCGCAAATAACTTCCTCCTCGGAGGCCTGGGGC
AATCCTTGTCGTCGCGGTCTGTTGGTGGGCGTAGTCGCCACCGTGACCACCTCCGGCAATAATAAGGCCGGCGACAACCTCAA
TGTCCCGGGTGAGGCCACCTTGCCACCTCCGGCAAGTCGGTCAAGTCTCTGTGCGCCCCACGCTGTACAAGGAGTCGTG
CGAGAAGACCTCACCTCGGCCTCCAATGGCACCGAGAACCCCAAAGAGGTCTTCGCCACCGTTGCCAAGTCGGCGATGGA
GTCGATCAAGTCCGCGGTGGAGCGGTCCCGCACTATCGGCGAGGCCAAGTCGAGCGACCCCTTGACGGAGGGCGCGGCCA
GGACTGCAAGGAGCTCCTGGAGGACTCCGTGGACGATCTCAAGGGCATGGTCGAGATGGCCGGCGGCGACATCAAGGTGCT
CCTTAGCCGCACCGACGACCTCGAGCACTGGATCACCGGCGTCATGACCTTCATCGACACCTGCGCCGATGGCTTCGCCGA
CGAGAAGCTCAAGGCAGACATGCAGGGCATCCTGCGCAACGCCACGGAGCTCAGCAGCAACCGGCTCGCCATCACCAACAG
CCTCGGCGCCATCTTCAAGAAGCTTGACCTCGACGTGTTCAAGACCGACTCGCGCCGCCGCTCTTGCTCTGCGGGGGAGTC
CAAGTACCCCGCGTGGATGAAGGCTCCAGAAAGGAAGCTACTGGCCTCCGGTGGCTTGCCAGCGCCGAACGCGGTTGTGGC

CAAGGACGGCAGCGGCAAATTCAAGACCATCCAGGATGCCGTGAACTCCATGCCCAAGGGTCACCCGGGCGGGGACGTCAT
 CTACGTCAAGGCTGGGGTCTACGAAAAGATGGTCATGGTCCCCAAGGACAAGGGGAACATATTCATGTACGGCGACGGCCC
 CAAGCAAAGCCGCGTCACCGGCAGCAAGAGCTTCGCCGACGGCATCACCACCATGAAGACCGCCACTTTCTGTGAGCCCTA
 GCTATAGCTAAGCTAGTATTTGGTGCAGCACGAGTAAGGTCAGGTTGCACAGGGCAATGCAGGTAGTAATTAACAAGTACG
 TATCTTGTCTGCTGCATGCTGCAGCCATTGAGGCGGCCGGGTTTCATCTGCAAGAACATGGGGTTCCACAACACGGCCGGCG
 CGGAGAAGCACCAGGCGGTGGCGCTGAGGGTGCAGGGCGACCTCTCGGCCTTCTTCAACTGCCGGTTCGACGCGTTCCAGG
 ACACGCTGTACGTGCACGCCCCGGCGCCAGTTCTTCCGCAACTGCGTCATCTCCGGCACCATCGACTTCATCTTCGGCAACT
 CGGCCGCCGTCTTCCAGAACTGCCTCATCATCACGCGCCGGCCCATGGACAACCAGCAGAACTCGGTGACCGCGCACGGCC
 GCACGGACCCCAACATGAAGTCCGGGCTGGTGATCCAGAACTGCCGCCTGGTGCCGGACCAGAAGCTGTTTCGCGGACCGCT
 TCAAGATCCCGTCTTACCTGGGCGCGCGTGGAAGGAGTTCTCGCGGCTGGTCATCATGGAGAGCATGATCGCCGACTTCA
 TCAAGCCCGAGGGGTACATGCCGTGGAACGGCGACTTCGGGCTCAAGACGCTCTACTACGCCGAGTTCGGCAACCGCGGCC
 CCGGCGCCGGCACCAGCAAGAGGGTCACCTGGCCGGGGTTCCGCGTCATCGGGAGGAAGGAGGCCGAGCAGTTCACCGCAG
 GGCCCTTCATCGACGGTGCACATGGCTCAAGTTCACCGGCACGCCCAACTACCTCGGGTTCAAGGTC**TAA**GCGCCCTCCT
 GTACATGAGATACGAGTCGATCGAGGTAACGTAATGTGTGTACGGAACGTGTGATGACTGATACTTGCAAGATCAGCTAAC
 CTTTCGCTGCTCCGTTATCACCTTCTGTTCTTTTCTGTGGTTTGTTCCTGGAGTTCTCTTTTCCTTGGTAAATGATTAAGTG
 TATGTTGTGACATCGATTAACTGGAAAAATGTATCATTAGATGCCCATTAAGTGCCTGCGTTTGCTACTACTCCACTAT
 TTTATGCTCATGCATGTTTGCTACACATCTGAACTTGTTATTTTGGACTACGTAGTAGTATACGTGACAGCACCAGGCAG
 AAGGGACTGACCGAACCTCTCCAATAATCTCCATGTACGCATTATCTTGTGTCTAACC CGGGTCAAAAACAACTTCCAAAG
 CAAGCTAGCATTTACGCCTCACCAAAATATCATGCATGCGCTCCGGCCTGGCATTCAACCATCCCCTAATGCGTGACGTCC
 GGCCGGACGCGGCAGGGTGATTACAAACTGCAATGAACTGGAATTAATAGAGGAAAGAGCCGCCGATCAGGCCCCGATACGT
 GT

Promotor y Downstream



Exón



Intrón



Start Codon y Stop Codon



Hipotética proteína

